Dit document vormt slechts een documentatiehulpmiddel en verschijnt buiten de verantwoordelijkheid van de instellingen

►**B**

RICHTLIJN 93/85/EEG VAN DE RAAD

van 4 oktober 1993

betreffendede bestrijding van aardappelringrot

(PB L 259 van 18.10.1993, blz. 1)

Gewijzigd bij:

		Publicatieblad		
		nr.	blz.	datum
►**M1**	Richtlijn 2006/56/EG van de Commissie van 12 juni 2006	L 182	1	4.7.2006

▼B

RICHTLIJN 93/85/EEG VAN DE RAAD

van 4 oktober 1993

betreffendede bestrijding van aardappelringrot

DE RAAD VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Economische Gemeenschap, inzonderheid op artikel 43,

Gezien het voorstel van de Commissie ([1]),

Gezien het advies van het Europees Parlement ([2]),

Gezien het advies van het Economisch en Sociaal Comité ([3]),

Overwegende dat in de landbouwproduktie van de Gemeenschap de aardappelproduktie een belangrijke plaats inneemt; dat schadelijke organismen een constante bedreiging voor de opbrengsten in de aardappelteelt vormen;

Overwegende dat door de aardappelteelt tegen deze schadelijke organismen te beschermen, niet alleen de produktie-capaciteit in stand wordt gehouden, maar tevens tot verhoging Van de landbouwproduktiviteit wordt bijgedragen;

Overwegende dat beschermende maatregelen om het binnenbrengen van schadelijke organismen op het grondgebied van een Lid-Staat te voorkomen, slechts een beperkt effect zouden sorteren indien geen maatregelen worden genomen om die organismen overal in de Gemeenschap gelijktijdig en systematisch onder controle te houden en verspreiding ervan te voorkomen;

Overwegende dat Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al. ssp. sepedonicus (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., het pathogene agens van aardappelringrot, voor aardappelen een van de schadelijke organismen is; dat deze ziekte in enkele delen van de Gemeenschap is opgetreden en dat er nog steeds enkele besmettingshaarden van geringe omvang zijn;

Overwegende dat deze ziekte voor de aardappelteelt, waar dan ook in de Gemeenschap, een aanzienlijk gevaar oplevert, indien geen adequate maatregelen worden genomen om de ziekte te lokaliseren en de verspreiding ervan te bepalen, om het optreden en de verspreiding ervan te voorkomen, en om, wanneer de ziekte eenmaal is aangetroffen, ervoor te zorgen dat zij zich niet verder kan verspreiden en onder controle wordt gehouden met het oogmerk haar uit te roeien;

Overwegende dat daartoe binnen de Gemeenschap een aantal maatregelen dient te worden genomen; dat de Lid-Staten zo nodig aanvullende of strengere maatregelen moeten kunnen vaststellen, met dien verstande dat het verkeer van aardappelen binnen de Gemeenschap daarvan in geen enkel opzicht hinder mag ondervinden, tenzij bij maatregelen op grond van Richtlijn 77/93/EEG ([4]); dat van dergelijke maatregelen aan de andere Lid-Staten en aan de Commissie kennis dient te worden gegeven;

Overwegende dat in Richtlijn 80/665/EEG van de Raad van 24 juni 1980 betreffende de bestrijding van ringrot bij aardappelen ([5]) is bepaald welke maatregelen de Lid-Staten ter bestrijding van aardappelringrot op zijn minst dienen te nemen;

Overwegende dat er zich wat de kennis van aardappelringrot en het opsporen van het pathogene agens van deze ziekte betreft, inmiddels significante ontwikkelingen hebben voorgedaan;

([1]) PB nr. C 93 van 2. 4. 1993, blz. 12.
([2]) PB nr. C 176 van 28. 6. 1993, blz. 210.
([3]) PB nr. C 161 van 14. 6. 1993, blz. 18.
([4]) PB nr. L 26 van 31. 1. 1977, blz. 20. Richtlijn laatstelijk gewijzigd bij Richtlijn 92/103/EEG van de Commissie (PB nr. L 363 van 11. 12. 1992, blz. 1).
([5]) PB nr. L 180 van 14. 7. 1980, blz. 30.

▼B

Overwegende dat, voor de toepassing van de communautaire regelgeving op fytosanitair gebied op de Gemeenschap als ruimte zonder binnengrenzen, sommige bepalingen van Richtlijn 80/665/EEG opnieuw moeten worden bezien en aangepast;

Overwegende dat bij dit heronderzoek is gebleken dat de bepalingen van Richtlijn 80/665/EEG ontoereikend zijn; dat het noodzakelijk is maatregelen nader te specificeren;

Overwegende dat Richtlijn 80/665/EEG derhalve dient te worden ingetrokken en de nodige maatregelen dienen te worden vastgesteld;

Overwegende dat daarbij ten eerste rekening dient te worden gehouden met het feit dat de ziekte zowel in de planten tijdens de groei als in knollen die worden bewaard, latent aanwezig en onopgemerkt kan blijven en derhalve alleen doeltreffend kan worden voorkomen door infectievrije pootaardappelen te telen en te gebruiken, en ten tweede met het feit dat systematische officiële onderzoeken moeten worden verricht om de ziekte te kunnen lokaliseren; dat de verspreiding van het pathogene agens tijdens de groei van het gewas niet de belangrijkste factor is, maar het pathogene agens wel kan overwinteren in in de bodem achtergebleven knollen die de belangrijkste haard vormen waardoor de ziekte zich in het daarop volgende seizoen opnieuw voordoet; dat het pathogene agens zich vooral verspreidt door contact met besmette aardappelen, of met poot-, oogst- of behandelingsmachines, of containers voor vervoer en opslag, die met besmette aardappelen in aanraking zijn geweest; dat besmette voorwerpen nog enige tijd na dergelijk contact besmettelijk blijven; dat verspreiding van het pathogene agens kan worden tegengegaan of voorkomen door dergelijke voorwerpen te desinfecteren; dat besmetting van pootaardappelen een groot risico voor verspreiding van het pathogene agens oplevert;

Overwegende dat het wenselijk is dat de Lid-Staten bij het uitwerken van de nadere bijzonderheden voor dergelijke algemene maatregelen en voor de door de Lid-Staten te treffen strengere of aanvullende maatregelen ter voorkoming van het binnenbrengen van het pathogene agens op hun grondgebied, nauw met de Commissie samenwerken binnen het Permanent Planteziektenkundig Comité, hierna het „Comité” genoemd,

HEEFT DE VOLGENDE RICHTLIJN VASTGESTELD:

Artikel 1

Deze richtlijn heeft betrekking op de in de Lid-Staten tegen Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al. ssp. sepedo-nicus (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., het agens dat aardappelringrot veroorzaakt, hierna „het organisme” genoemd, te nemen maatregelen:

a) om het te lokaliseren en de verspreiding ervan te bepalen;

b) om het optreden en de verspreiding te voorkomen; en

c) indien het organisme wordt aangetroffen, verspreiding ervan te voorkomen en het onder controle te houden met het oog op uitroeiing ervan.

Artikel 2

1. De Lid-Staten verrichten systematisch officiële onderzoeken op aardappelknollen, of indien passend, op aardap-pelplanten (Solanum tuberosum L.) die van hun grondgebied afkomstig zijn, om de aanwezigheid dan wel de afwezigheid van het organisme vast te stellen.

Met het oog daarop worden voor wat betreft de knollen, van zowel pootaardappelen als van andere aardappelen, monsters genomen, bij voorkeur uit partijen die zijn opgeslagen; de monsters worden officieel of onder officieel toezicht in een laboratorium getest volgens de in bijlage I beschreven methode om het organisme op te sporen en te identificeren. In aanvulling daarop kunnen, waar passend, de monsters van andere knollen worden doorgesneden voor een officiële of onder officieel toezicht verrichte visuele keuring.

▼B

Voor planten worden deze onderzoeken verricht volgens passende methoden en worden de monsters officieel of onder officieel toezicht getest.

Hoeveel, waar en op welk tijdstip monsters worden genomen en hoe de samenstelling ervan dient te zijn, wordt op grond van deugdelijke wetenschappelijke en statistische beginselen en van de biologische eigenschappen van het organisme door de in Richtlijn 77/93/EEG bedoelde verantwoordelijke officiële instanties bepaald; daarbij wordt rekening gehouden met de voor de betrokken Lid-Staten specifieke teeltmethoden. Aan de andere Lid-Staten en aan de Commissie worden jaarlijks de bijzonderheden daarvan medegedeeld om te waarborgen dat voor de bevestiging dat het organisme niet voorkomt, de Lid-Staten gelijkwaardige niveaus van garantie bieden.

2. De uitkomsten van de in lid l bedoelde officiële onderzoeken worden ten minste eenmaal per jaar aan de andere Lid-Staten en aan de Commissie medegedeeld. De daarbij verstrekte gegevens zijn vertrouwelijk. Zij kunnen volgens de procedure van artikel 16 bis van Richtlijn 77/93/EEG aan het Comité worden voorgelegd.

3. Volgens de procedure van artikel 16 bis van Richtlijn 77/93/EEG kunnen bepalingen worden vastgesteld met betrekking tot:

— de in lid l bedoelde onderzoeken, die volgens deugdelijke wetenschappelijke en statistische beginselen moeten worden verricht;

— de in lid 2 bedoelde kennisgeving.

4. Volgens de procedure van artikel 16 bis van Richtlijn 77/93/EEG worden bepalingen vastgesteld ten aanzien van

— de passende methoden voor de onderzoeken en de tests als bedoeld in lid 1, derde alinea.

Artikel 3

De Lid-Staten waarborgen dat het vermoede optreden en de bevestigde aanwezigheid van het organisme in aardappel-planten en -knollen of op hun grondgebied geoogste opgeslagen of verhandelde knollen aan hun eigen verantwoordelijke officiële instanties wordt gemeld.

Artikel 4

1. Indien het optreden van het organisme wordt vermoed, dienen de verantwoordelijke officiële instanties van de Lid-Staat waar dat geval wordt gemeld toe te zien op de volledige afwikkeling van het officiële of onder officieel toezicht verrichte laboratoriumonderzoek volgens de in bijlage I aangegeven methode en met inachtneming van het bepaalde in bijlage II, punt l, ten einde het vermoede optreden van het organisme te bevestigen dan wel het tegenbewijs te kunnen melden. Indien blijkt dat het orga-nisme is opgetreden, geldt het bepaalde in bijlage II, punt 2.

2. In afwachting van de bevestiging van het vermoede optreden of van het tegenbewijs, als bedoeld in lid l, in de gevallen waarin:

i) verdachte diagnostische visuele symptomen van de ziekte zijn waargenomen, of,

ii) een positieve uitkomst van de immunofluorescentietest als beschreven in bijlage I of andere passende positieve testuitkomsten zijn verkregen,

dienen de verantwoordelijke officiële instanties van de Lid-Staten:

a) te verbieden dat partijen of zendingen waarvan de monsters zijn genomen, worden verplaatst zolang over de vermoede besmetting nog geen uitsluitsel bestaat, tenzij de verplaatsing onder hun toezicht en mits is vastgesteld dat er voor de verspreiding van het organisme geen aanwijsbaar risico bestaat;

b) het nodige te doen om de oorsprong van het vermoede optreden van het organisme te achterhalen;

▼B

c) op grond van een risico-evaluatie passende aanvullende preventieve maatregelen vast te stellen om iedere vorm van verspreiding van het organisme te voorkomen, waaronder officieel toezicht op de verplaatsing van alle overige knollen of planten binnen of buiten het bedrijfsterrein waaromtrent het vermoeden bestaat dat daar het organisme is opgetreden.

3. De volgende maatregelen kunnen worden vastgesteld volgens de procedure van artikel 16 bis van Richtlijn 77/93/EEG:

— de maatregelen als bedoeld in lid 2, onder c).

4. De volgende maatregelen worden vastgesteld volgens de procedure van artikel 16 bis van Richtlijn 77/93/ EEG:

— de andere passende tests als bedoeld in lid 2, onder ii).

Artikel 5

1. Wanneer het officiële of onder officieel toezicht verrichte laboratoriumonderzoek waarbij de in bijlage I beschreven methode is toegepast, de aanwezigheid van het organisme in het monster van knollen, planten of plantedelen bevestigt, nemen de verantwoordelijke officiële instanties van een Lid-Staat, rekening houdend met deugdelijke wetenschappelijke beginselen, de biologische eigenschappen van het organisme en de in de Lid-Staten gebruikelijke teelt-, afzet- en behandelingsmethoden, de volgende maatregelen:

a) de knollen of planten, de zending en/of de partij, alsmede de machines, het voer- of vaartuig, de opslagplaats, of delen daarvan en enig ander voorwerp, verpakkingsmateriaal inbegrepen, waaruit het monster werd genomen, en, in voorkomend geval, de plaats(en) van produktie en het veld (de velden) waarop de knollen of planten zijn geoogst, worden besmet verklaard;

b) rekening houdend met punt l van bijlage III, wordt de omvang bepaald van de waarschijnlijke besmetting hetzij door contact met de aangewezen besmettingsbron, vóór of na de oogst, hetzij door contact met de besmettingsbron via de teeltwijze;

c) rekening houdend met punt 2 van bijlage III, wordt er een zone afgebakend, uitgaande van de besmetverkla-ring als bedoeld onder a), van de omvang van de waarschijnlijke besmetting als bedoeld onder b) en van de mogelijke verspreiding van het organisme.

2. De Lid-Staten geven op de in bijlage III, punt 3, vastgestelde wijze de andere Lid-Staten en de Commissie onverwijld kennis van elke besmetverklaring als bedoeld in lid 1, onder a), en verstrekken omtrent de zoneafbakening als bedoeld in lid l, onder c), nadere bijzonderheden.

De daarbij verstrekte nadere gegevens zijn vertrouwelijk. Zij kunnen aan het Comité worden voorgelegd volgens de procedure van artikel 16 bis van Richtlijn 77/93/EEG.

3. Als gevolg van de in lid 2 bedoelde kennisgeving en de daarin vermelde gegevens wordt door de andere, in de kennisgeving vermelde Lid-Staten, zo nodig, overgegaan tot besmetverklaring(en), bepaling van de omvang van de waarschijnlijke besmetting en afbakening van een zone overeenkomstig het bepaalde in lid l, onder, respectievelijk, de punten a), b) en c).

Artikel 6

De Lid-Staten bepalen dat, wanneer knollen of planten krachtens artikel 5, lid l, onder a), besmet zijn verklaard, de voorraden aardappelen die via het kloonmateriaal verwant zijn met de aardappelen waarin de besmetting is opgetreden, overeenkomstig artikel 4, lid 1, worden onderzocht. De onderzoeken worden verricht op zoveel knollen of planten als nodig om de waarschijnlijke primaire besmettingsbron vast te stellen en de omvang van de waarschijnlijke besmetting te bepalen, bij voorkeur in volgorde van de risicofactor.

Op grond van de uitkomsten van de onderzoeken wordt zo nodig nog overgegaan tot verdere besmetverklaringen, tot bepaling van de omvang van de waarschijnlijke besmetting en tot afbakening van een zone, overeenkomstig artikel 5, lid l, onder, respectievelijk, de punten a), b) en c).

▼B

Artikel 7

1. De Lid-Staten bepalen dat de knollen of planten die krachtens artikel 5, lid l, onder a), besmet zijn verklaard, niet mogen worden gepoot of uitgeplant en dat die knollen of planten onder toezicht van de verantwoordelijke officiële instanties:

— worden vernietigd, of

— onder officieel toezicht op de in bijlage IV, punt l, vastgestelde wijze, worden opgeruimd, mits wordt vastgesteld dat er geen aanwijsbaar risico voor verspreiding van het organisme bestaat.

2. De Lid-Staten bepalen dat knollen of planten waarvan overeenkomstig artikel 5, lid 1, onder b), is vastgesteld dat zij waarschijnlijk besmet zijn, niet mogen worden gepoot of uitgeplant en, onverminderd het resultaat van de in artikel 6 bedoelde onderzoeken betreffende verwant klonaal materiaal, onder toezicht van de verantwoordelijke officiële instanties overeenkomstig bijlage IV, punt 2, voor geëigend gebruik of adequate opruiming worden bestemd, mits is vastgesteld dat er voor verspreiding van het organisme geen aanwijsbaar risico bestaat.

3. De Lid-Staten bepalen dat machines, voer- of vaartuigen, opslagplaatsen, of delen daarvan, en andere voorwerpen, verpakkingsmateriaal inbegrepen, die overeenkomstig artikel 5, lid 1, onder a), besmet zijn verklaard of waarvan overeenkomstig artikel 5, lid 1, onder b), is vastgesteld dat zij waarschijnlijk besmet zijn, of wel worden vernietigd, of wel volgens de in bijlage IV, punt 3, beschreven adequate methoden worden gereinigd en gedesinfecteerd. Dergelijke voorwerpen worden na desinfectie niet langer als besmet beschouwd.

4. Onverminderd de maatregelen die krachtens de leden l, 2 en 3 van dit artikel worden genomen, bepalen de Lid-Staten dat in de overeenkomstig artikel 5, lid 1, onder c), afgebakende zone een reeks maatregelen wordt genomen, zoals gespecificeerd in bijlage IV, punt 4.

Artikel 8

1. De Lid-Staten bepalen dat pootaardappelen moeten voldoen aan de in Richtlijn 77/93/EEG vervatte eisen en in rechte lijn moeten afstammen van in het kader van een officieel goedgekeurd programma verkregen materiaal dat bij officiële of onder officieel toezicht verrichte onderzoeken waarbij de in bijlage I bedoelde methode is gevolgd, vrij van het organisme is bevonden.

Bovenbedoelde onderzoeken worden verricht:

— op de planten die als basismateriaal voor het klonen hebben gediend, wanneer de besmetting betrekking heeft op de pootaardappelproduktie;

— op de planten die als basismateriaal voor het klonen hebben gediend, of op representatieve monsters van het basispootgoed of op teeltmateriaal van aan het basis-pootgoed voorafgaande generaties, in de overige gevallen.

2. Volgens de procedure van artikel 16 bis van Richtlijn 77/93/EEG kunnen worden vastgesteld:

— de nadere toepassingsbepalingen van lid l, tweede alinea, eerste streepje;

— de bepalingen betreffende de representatieve monsters als bedoeld in lid 1, tweede alinea, tweede streepje.

Artikel 9

De Lid-Staten verbieden het voorhanden hebben en het gebruik van het organisme.

Artikel 10

Onverminderd de bepalingen van Richtlijn 77/93/EEG, mogen de Lid-Staten toestaan dat voor experimenten, voor wetenschappelijke doeleinden of voor selectiewerkzaamhe-den wordt afgeweken van het

▼B

bepaalde in de artikelen 6, 7 en 9 van deze richtlijn, op voorwaarde dat die afwijkingen geen afbreuk doen aan de bestrijding van het organisme en er geen risico voor verspreiding van het organisme ontstaat.

Artikel 11

De Lid-Staten mogen aanvullende of strengere maatregelen vaststellen wanneer dit nodig is om het organisme te bestrijden of om spreiding ervan te voorkomen, voor zover die maatregelen in overeenstemming zijn met het bepaalde in Richtlijn 77/93/EEG.

De aanvullende maatregelen als bedoeld in de eerste alinea kunnen onder meer bestaan in het voorschrijven dat alleen pootaardappelen mogen worden gepoot die hetzij officieel gecertificeerd zijn, hetzij een officiële inspectie hebben ondergaan waaruit is gebleken dat zij aan de voorgeschreven fytosanitaire normen voldoen. De laatstgenoemde mogelijkheid kan met name van toepassing zijn in gevallen waarin landbouwers op hun eigen gebruik mogen maken van pootaardappelen die zij uit hun eigen oogst hebben verkregen, alsmede in andere gevallen waarin zelf geproduceerde pootaardappelen worden gepoot.

Van de bijzonderheden van die maatregelen wordt aan de andere Lid-Staten en aan de Commissie kennis gegeven.

Artikel 12

De op grond van de stand van wetenschap of techniek in de bijlagen bij de onderhavige richtlijn aan te brengen wijzigingen worden vastgesteld volgens de procedure van artikel 16 bis van Richtlijn 77/93/EEG.

Artikel 13

1. Uiterlijk op 15 november 1993 dienen de Lid-Staten de bepalingen om aan deze richtlijn te voldoen aan te nemen en bekend te maken. Zij stellen de Commissie daarvan onverwijld in kennis.

Wanneer de Lid-Staten deze bepalingen aannemen, wordt in die bepalingen naar de onderhavige richtlijn verwezen of wordt hiernaar verwezen bij de officiële bekendmaking van die bepalingen. De regels voor deze verwijzing worden vastgesteld door de Lid-Staten.

De Lid-Staten passen deze bepalingen toe met ingang van 16 november 1993.

2. De Lid-Staten delen de Commissie onverwijld alle bepalingen van intern recht mede die zij op het onder deze richtlijn vallende gebied vaststellen. De Commissie stelt de andere Lid-Staten daarvan in kennis.

Artikel 14

Richtlijn 80/665/EEG wordt ingetrokken met ingang van 16 november 1993.

Artikel 15

Deze richtlijn is gericht tot de Lid-Staten.

▼**M1**

BIJLAGE I

ONDERZOEKSMETHODE VOOR DE DIAGNOSE, DETECTIE EN IDENTIFICATIE VAN DE RINGROTBACTERIE, *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* **(Smith) Davis** *et al.* **ssp.** *SEPEDONICUS* **(Spieckermann et Kotthoff) Davis** *et al.*

OVERZICHT VAN DE ONDERZOEKSMETHODE

Deze onderzoeksmethode beschrijft de verschillende procedures voor:

i) de diagnose van ringrot in aardappelknollen en -planten;

ii) de detectie van *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in monsters van aardappelknollen en -planten;

iii) de identificatie van *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*C. m.* ssp. *sepedonicus*).

ALGEMENE BEGINSELEN

In de aanhangsels worden geoptimaliseerde protocollen voor de verschillende methoden, gevalideerde reagentia, en nadere bijzonderheden betreffende de bereiding van analyse- en controlemateriaal beschreven. Aanhangsel 1 bevat een lijst van laboratoria die bij de optimalisering en validering van de protocollen zijn betrokken.

Aangezien de protocollen betrekking hebben op de detectie van een quarantaineorganisme en daarbij levensvatbare culturen van *C. m.* ssp. *sepedonicus* als controlemateriaal gebruikt worden, moeten de procedures onder adequate quarantaineomstandigheden met de nodige faciliteiten voor afvalverwijdering worden uitgevoerd en moeten de officiële autoriteiten voor plantenquarantaine de vereiste vergunningen hebben verstrekt.

De testparameters moeten zodanig zijn dat *C. m.* ssp. *sepedonicus* bij de drempelwaarden die voor de gekozen methoden zijn vastgesteld op consistente en reproduceerbare wijze gedetecteerd wordt.

Het is essentieel dat de positieve controlemonsters zorgvuldig bereid worden.

Om de testen met de vereiste drempelwaarden te kunnen verrichten moet verder de apparatuur juist ingesteld, in goede staat van onderhoud en geijkt zijn, moeten de reagentia zorgvuldig gehanteerd en bewaard worden en moeten alle maatregelen worden genomen om kruisbesmetting tussen de monsters te voorkomen; zo moeten de positieve controlemonsters gescheiden van de analysemonsters bewaard worden. Er moeten kwaliteitsbewakingsnormen worden toegepast om administratieve en andere fouten te vermijden, met name bij de etikettering en documentatie.

Een vermoed optreden als bedoeld in artikel 4, lid 2, van Richtlijn 93/85/EEG betekent dat een positieve uitslag is verkregen bij een diagnostische of screeningtest op een monster zoals aangegeven in de stroomdiagrammen.

Als de eerste screeningtest (IF of PCR/FISH) positief is, wordt besmetting met *C. m.* ssp. *sepedonicus* vermoed en moet een tweede screeningtest worden uitgevoerd. Is de tweede screeningtest ook positief, dan wordt het vermoeden bevestigd (vermoed optreden) en moeten de testen volgens de onderzoeksmethode worden voortgezet. Als de tweede screeningtest negatief is, wordt aangenomen dat het monster niet met *C. m.* ssp. *sepedonicus* besmet is.

Een positieve IF-test als bedoeld in artikel 4, lid 2, is dus gedefinieerd als een positieve IF-uitslag die door een tweede screeningtest (PCR/FISH) is bevestigd.

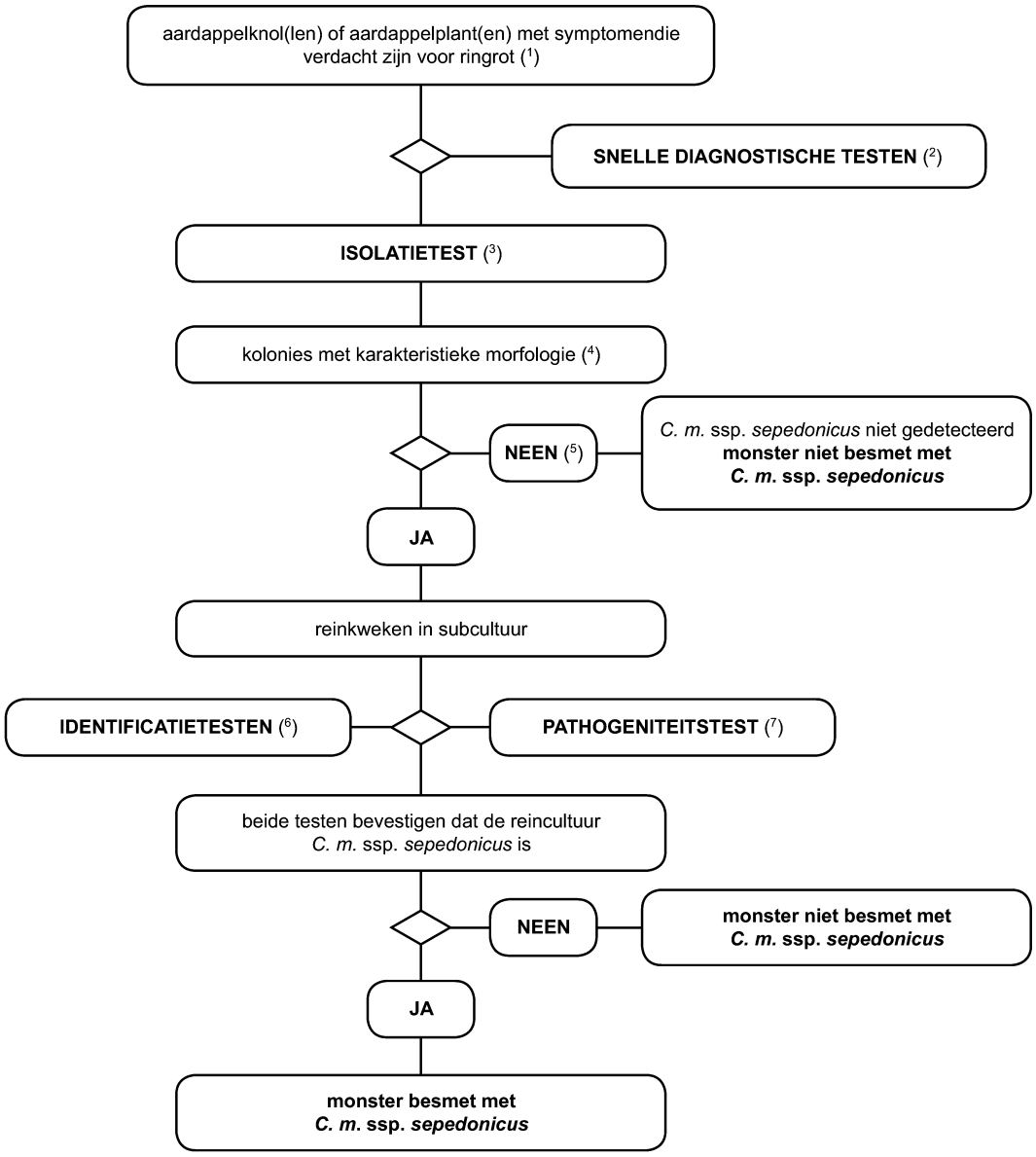
Onder bevestigde aanwezigheid als bedoeld in artikel 5, lid 1, wordt verstaan dat een reincultuur van *C. m.* ssp. *sepedonicus* is geïsoleerd en geïdentificeerd en de pathogeniteit ervan bevestigd is.

1. WEERGAVE IN STROOMDIAGRAM

1.1. **Methode voor de diagnose van ringrot in aardappelknollen en -planten met symptomen van ringrot**

De testprocedure is bedoeld voor aardappelknollen en -planten met symptomen die karakteristiek zijn voor ringrot of een vermoeden daarvan doen rijzen. Dit omvat een snelle screeningtest, isolatie van het pathogeen uit geïnfecteerd vaatweefsel op diagnostische media en, in geval van een positieve uitslag, identificatie van de cultuur als *C. m.* ssp. *sepedonicus*.

▼**M1**



(1) De symptomen worden in deel 2 beschreven.

(2) Geschikte testen zijn:
— IF-test (deel 4),
— PCR-test (deel 6),
— FISH-test (deel 5).

(3) Hoewel isolatie van het pathogeen uit plantenmateriaal met typische symptomen door verdunnen en uitplaten betrekkelijk eenvoudig is, kan het kweken uit vergevorderde infectiestadia mislukken. Saprofytische bacteriën die op aangetast weefsel groeien, kunnen het pathogeen op het isolatiemedium overwoekeren of remmen. Daarom wordt aanbevolen om zowel niet-selectieve als selectieve media te gebruiken, bij voorkeur MTNA (deel 8) of de bioassay (deel 7).

(4) De karakteristieke koloniemorfologie wordt in deel 8 beschreven.

(5) Als de isolatietest negatief is maar de ziekteverschijnselen karakteristiek zijn, moet de isolatie worden herhaald.

(6) Met de in deel 9 beschreven testen worden reinculturen van *C. m.* ssp. *sepedonicus* betrouwbaar geïdentificeerd.

(7) De pathogeniteitstest wordt in deel 10 beschreven.

▼**M1**

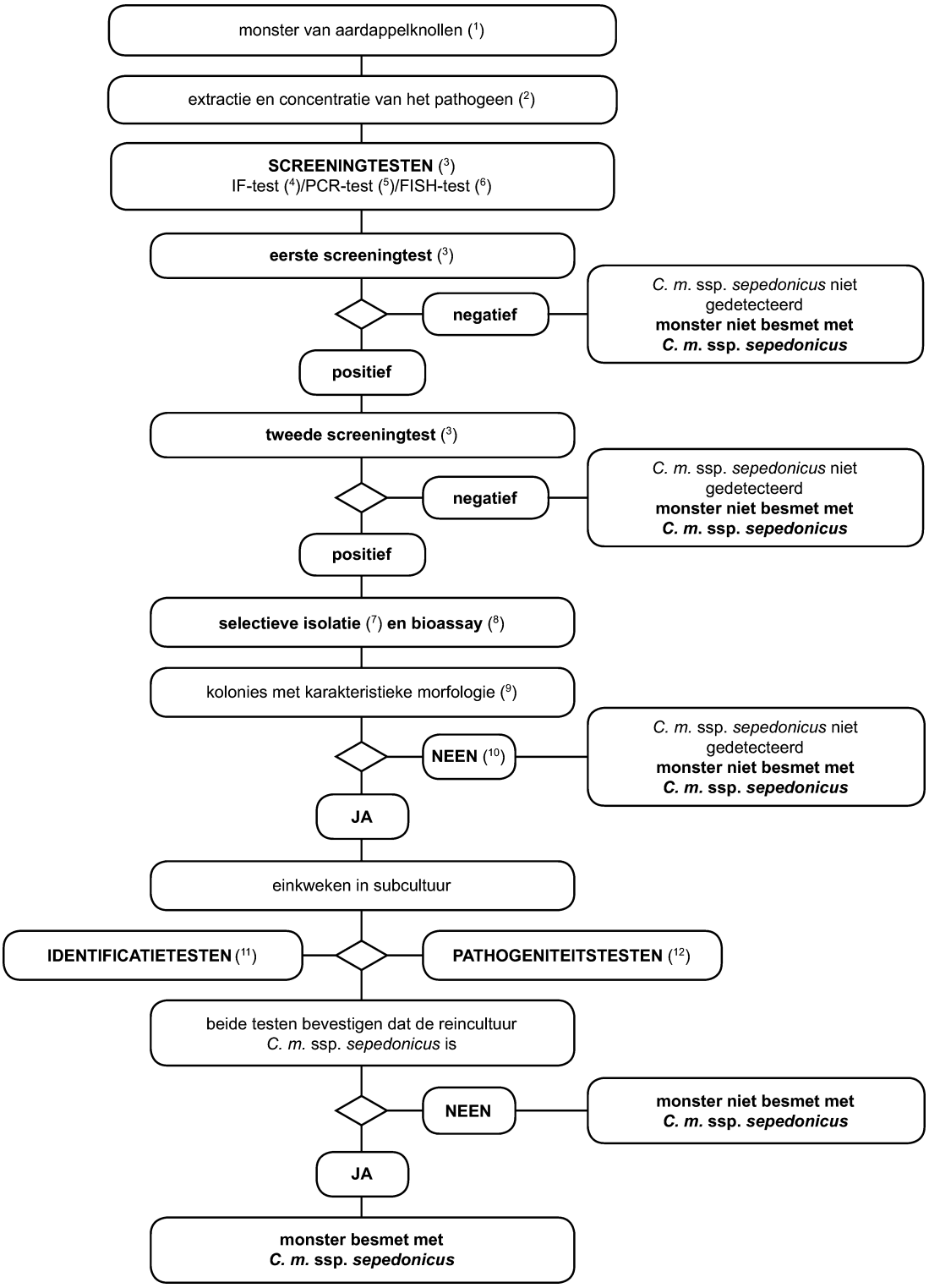
1.2. **Methode voor de detectie en identificatie van** *Clavibacter michiganensis* **ssp.** *sepedonicus* **in monsters van symptoomloze aardappelknollen**

Principe

Deze testprocedure is bedoeld voor het opsporen van latente infecties in aardappelknollen. Een positieve uitslag bij ten minste twee, op verschillende biologische principes gebaseerde screeningtesten moet worden bevestigd door isolatie van het pathogeen. In geval van isolatie van karakteristieke kolonies wordt de procedure vervolgd door identificatie van een reincultuur als *C. m.* ssp. *sepedonicus*. Een positieve uitslag bij slechts één van de screeningtesten is niet voldoende om het monster als verdacht aan te merken.

Met de screening- en isolatietesten moet een detectiegrens worden gehaald van 10^3-10^4 cellen/ml van de geresuspendeerde pellet die als positieve controle aan elke testreeks wordt toegevoegd.

▼M1


monster van aardappelknollen (1)
extractie en concentratie van het pathogeen (2)
SCREENINGTESTEN (3)
IF-test (4)/PCR-test (5)/FISH-test (6)
eerste screeningtest (3)
negatief
C. m. ssp. sepedonicus niet gedetecteerd
monster niet besmet met C. m. ssp. sepedonicus
positief
tweede screeningtest (3)
negatief
C. m. ssp. sepedonicus niet gedetecteerd
monster niet besmet met C. m. ssp. sepedonicus
positief
selectieve isolatie (7) en bioassay (8)
kolonies met karakteristieke morfologie (9)
NEEN (10)
C. m. ssp. sepedonicus niet gedetecteerd
monster niet besmet met C. m. ssp. sepedonicus
JA
einkweken in subcultuur
IDENTIFICATIETESTEN (11)
PATHOGENITEITSTESTEN (12)
beide testen bevestigen dat de reincultuur C. m. ssp. sepedonicus is
NEEN
monster niet besmet met C. m. ssp. sepedonicus
JA
monster besmet met C. m. ssp. sepedonicus

▼**M1**

(1) De standaardmonstergrootte is 200 knollen, maar de procedure kan met kleinere monsters worden uitgevoerd als er geen 200 knollen beschikbaar zijn.

(2) De methoden voor de extractie en concentratie van het pathogeen worden in deel 3.1 beschreven.

(3) Als ten minste twee, op verschillende biologische principes gebaseerde testen een positieve uitslag geven, zijn isolatie en bevestiging vereist. Er wordt eerst ten minste één screeningtest uitgevoerd. Wanneer deze test negatief is, wordt het monster als negatief beschouwd. Als de testuitslag positief is, moeten een tweede en eventueel nog verdere screeningtests op basis van andere biologische principes worden verricht om de eerste positieve uitslag te bevestigen. Indien de tweede of andere testen negatief zijn, wordt het monster als negatief beschouwd. In dat geval hoeven geen verdere testen te worden verricht.

(4) Immunofluorescentie (IF)-test.
Gebruik altijd een polyklonaal antilichaam voor de IF-screening; daarnaast kunnen monoklonale antilichamen de specificiteit verhogen (zie deel 4).

(5) PCR-test.
Gebruik naar behoren gevalideerde PCR-reagentia en -protocollen (zie deel 6).

(6) FISH-test.
Gebruik gevalideerde reagentia en protocollen (zie deel 5).

(7) Selectieve isolatie.
Bij gebruik van MTNA of NCP-88 als medium met een honderdvoudige verdunning van de geresuspendeerde pellet is deze methode vaak geschikt voor directe isolatie van *C. m.* ssp. *sepedonicus*. Karakteristieke kolonies worden 3-10 dagen na het uitplaten verkregen. Dan kan het pathogeen reingekweekt en geïdentificeerd worden. Om het potentieel van deze test ten volle te benutten moeten zeer zorgvuldig preparaten van stukjes van het naveleinde worden gemaakt om te vermijden dat secundaire met aardappelknollen geassocieerde bacteriën in het extract terechtkomen. Deze kunnen met *C. m.* ssp. *sepedonicus* op het medium concurreren en het pathogeen overgroeien. Als de uitplatingstest mislukt, moet de bacterie worden geïsoleerd uit de planten in de bioassay (zie deel 8).

(8) De bioassay dient voor de isolatie van *C. m.* ssp. *sepedonicus* uit aardappelextractpellets door selectieve ophoping in aubergines (*Solanum melongena*). De test vereist optimale incubatievoorwaarden zoals in deze methode worden beschreven. Bacteriën die op het MTNA- of NCP-88-medium een remmend effect op *C. m.* ssp. *sepedonicus* hebben, verstoren deze test hoogstwaarschijnlijk niet (zie deel 7).

(9) De karakteristieke koloniemorfologie wordt in deel 8 beschreven.

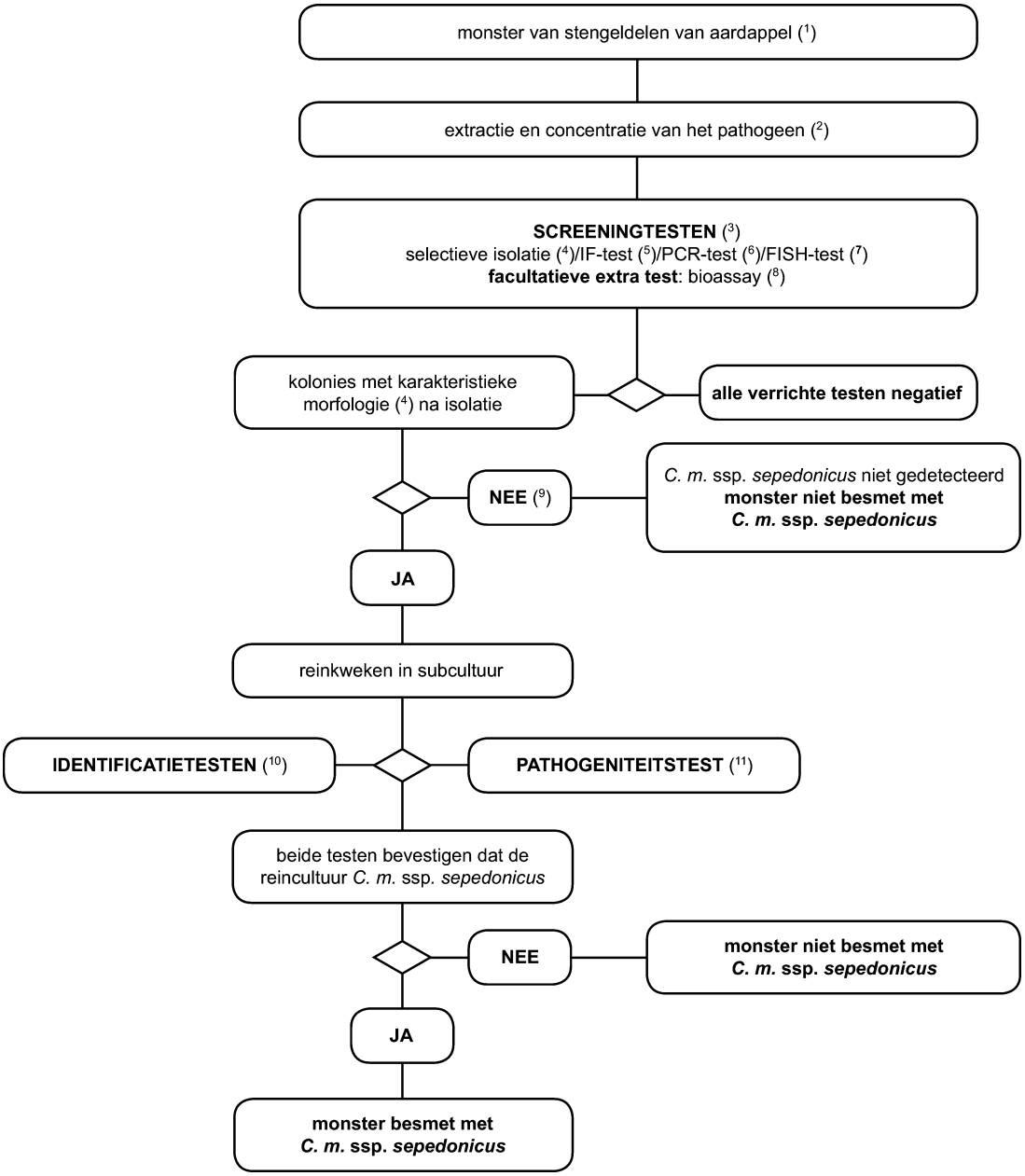
(10) Kweken en bioassays kunnen mislukken als gevolg van concurrentie of remming door saprofytische bacteriën. Als in screeningtests een positieve uitslag is verkregen maar de isolatietesten negatief zijn, moeten de isolatietesten herhaald worden met dezelfde pellet of door nog meer vaatweefsel rond de navel van gesneden knollen van hetzelfde monster te nemen; zo nodig moeten meer monsters worden getest.

(11) Met de in deel 9 beschreven testen worden reinculturen die vermoedelijk uit *C. m.* ssp. *sepedonicus* bestaan betrouwbaar geïdentificeerd.

(12) De pathogeniteitstest wordt in deel 10 beschreven.

▼M1

1.3. **Methode voor de detectie en identificatie van** *Clavibacter michiganensis* **ssp.** *sepedonicus* **in monsters van symptoomloze aardappelplanten**



▼**M1**

(1) Zie deel 3.2 voor aanbevolen monstergrootten.

(2) De methoden voor de extractie en concentratie van het pathogeen worden in deel 3.2 beschreven.

(3) Als ten minste twee, op verschillende biologische principes gebaseerde testen een positieve uitslag geven, zijn isolatie en bevestiging vereist.
Er wordt eerst ten minste één screeningtest uitgevoerd. Wanneer deze test negatief is, wordt het monster als negatief beschouwd. Als de testuitslag positief is, moeten een tweede en eventueel nog verdere screeningtests op basis van andere biologische principes worden verricht om de eerste positieve uitslag te bevestigen. Indien de tweede of andere testen negatief zijn, wordt het monster als negatief beschouwd. In dat geval hoeven geen verdere testen te worden verricht.

(4) De selectieve-isolatietest en de karakteristieke koloniemorfologie worden in deel 8 beschreven.

(5) De IF-test wordt in deel 4 beschreven.

(6) De PCR-testen worden in deel 6 beschreven.

(7) De FISH-test wordt in deel 5 beschreven.

(8) De bioassay wordt in deel 7 beschreven.

(9) Kweken en bioassays kunnen mislukken als gevolg van concurrentie of remming door saprofytische bacteriën. Als in screeningtesten een positieve uitslag is verkregen maar de isolatietesten negatief zijn, moeten de isolatietesten worden herhaald en moeten zo nodig meer monsters worden getest.

(10) Met de in deel 9 beschreven testen kunnen reinculturen die vermoedelijk uit *C. m.* ssp. *sepedonicus* bestaan betrouwbaar geïdentificeerd worden.

(11) De pathogeniteitstest wordt in deel 10 beschreven.

▼M1

2. VISUEEL ONDERZOEK NAAR RINGROTSYMPTOMEN

2.1. **Aardappelplanten**

In ons Europese klimaat worden symptomen zelden in het veld aangetroffen en dan vaak nog slechts aan het eind van het seizoen. Bovendien worden de symptomen dikwijls gemaskeerd of vertroebeld door andere ziekten, veroudering of mechanische schade. Daarom kunnen de symptomen bij veldinspecties gemakkelijk worden gemist. De verwelkingssymptomen verschillen sterk van die van bruinrot; de verwelking verloopt doorgaans traag en beperkt zich in eerste instantie tot de bladranden. Jonge geïnfecteerde bladeren blijven vaak doorgroeien, maar minder in de geïnfecteerde delen. Daardoor krijgen de bladeren een afwijkende vorm. Wanneer het vaatweefsel in de stengel geblokkeerd is, vertonen de bladeren daarboven vaak een bleekgele tot oranje verkleuring in de zones tussen de nerven. Geïnfecteerde blaadjes, bladeren en zelfs stengels kunnen uiteindelijk afsterven. Vaak zijn de bladeren en knollen alleen wat kleiner dan normaal. Soms treedt dwerggroei op. Kleurenfoto's van diverse symptomen kunnen worden bekeken op de website: http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main.

2.2. **Aardappelknollen**

De eerste symptomen zijn een lichte glazigheid of doorschijnendheid van het weefsel, zonder verzachting rond het vaatstelsel, vooral bij de navel. De vaatring bij het naveleinde kan iets donkerder van kleur zijn dan normaal. Het eerste gemakkelijk te herkennen symptoom is een geelachtige verkleuring van de vaatring en kolommetjes van kaasachtig materiaal dat uit de vaten komt wanneer er zacht in de knol geknepen wordt. Deze afscheiding bevat miljoenen bacteriën. Het vaatweefsel kan bruin worden en de symptomen die de knollen in dit stadium vertonen, lijken op die van bruinrot door *Ralstonia solanacearum.* Aanvankelijk kunnen deze symptomen beperkt blijven tot een deel van de ring, dat overigens niet dicht bij het naveleinde hoeft te liggen, waarna zij zich geleidelijk kunnen uitbreiden tot de hele ring. Naarmate de infectie voortschrijdt wordt het vaatweefsel vernietigd. De buitencortex kan loskomen van de binnencortex. In de gevorderde stadia van de infectie ontstaan er barsten aan het oppervlak van de knol, die vaak aan de randen roodachtig bruin zijn. Recentelijk hebben zich in Europa verscheidene gevallen voorgedaan waarbij in de centrale cortex en de vaatring tegelijk verrotting optrad, met als gevolg secundaire invasie met inwendige uitholling en necrose. Een secundaire aantasting door schimmels of bacteriën kan de symptomen maskeren en het kan moeilijk, zo niet onmogelijk zijn, gevorderde ringrotsymptomen te onderscheiden van andere soorten knolrot. Er kunnen atypische symptomen voorkomen. Kleurenfoto's van diverse symptomen kunnen worden bekeken op de website: http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

3. BEREIDING VAN DE MONSTERS

3.1. **Aardappelknollen**

Opmerkingen:

— De standaardmonstergrootte is 200 knollen per test. Intensievere bemonstering houdt in dat er meer testen op monsters van deze grootte worden genomen. Wanneer een groter aantal knollen wordt genomen, treedt remming op of zijn de resultaten moeilijk te interpreteren. De procedure is echter ook goed toepasbaar voor monsters van minder dan 200 knollen, wanneer er niet zo veel beschikbaar zijn.

— De hierna beschreven detectiemethoden zijn gevalideerd met monsters van 200 knollen.

— Het hierna beschreven aardappelextract kan ook worden gebruikt voor de detectie van de bruinrotbacterie, *Ralstonia solanacearum.*

De optimale voorbereiding met het oog op de bereiding van het monster is als volgt.

Was de knollen. Gebruik geschikte ontsmettingsmiddelen (wanneer een PCR-test uitgevoerd zal worden chloorverbindingen om eventueel aanwezig pathogeen-DNA te verwijderen) en reinigingsmiddelen na elk monster. Laat de knollen aan de lucht drogen. Deze wasprocedure is vooral nuttig, maar niet verplicht, voor monsters met veel aanhangende grond en als een PCR-test of directe isolatie moet worden uitgevoerd.

▼**M1**

3.1.1. Verwijder met een schoon, ontsmet scalpel of aardappelschilmes de schil aan het naveleinde van elke knol, zodat het vaatweefsel zichtbaar wordt. Snijd voorzichtig een kleine kegelvormige kern vaatweefsel uit het naveleinde van elke knol en zorg er daarbij voor dat deze zo weinig mogelijk niet-vaatweefsel bevat (zie de website: http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main)

NB:

Houd (rottende) knollen met verdachte symptomen apart en test die afzonderlijk.

Als bij het uitsnijden van het naveleindstukje voor ringrot verdachte symptomen worden waargenomen, moet de knol visueel worden onderzocht na bij de navel te zijn doorgesneden. Doorgesneden knollen met verdachte symptomen moet men ten minste twee dagen bij kamertemperatuur laten verkurken waarna zij onder quarantaine-omstandigheden bij 4-10 °C worden bewaard totdat alle testen zijn uitgevoerd. Alle knollen van het monster, ook die met verdachte symptomen, moeten overeenkomstig bijlage II worden bewaard.

3.1.2. Verzamel de naveleindstukjes in ongebruikte, afsluitbare en/of verzegelbare wegwerpcontainers (als de containers wel opnieuw gebruikt worden, moeten ze grondig worden gereinigd en met chloorverbindingen worden ontsmet. De naveleindstukjes moeten bij voorkeur direct worden verwerkt. Is dat niet mogelijk, dan moeten zij zonder toevoeging van buffer in de container worden bewaard; gekoeld mogen zij hooguit 72 uur worden bewaard, bij kamertemperatuur hooguit 24 uur. Door droging en verkurking van de stukjes en groei van saprofyten tijdens de opslag kan de detectie van de ringrotbacterie bemoeilijkt worden.

3.1.3. Verwerk de naveleindstukjes volgens een van onderstaande procedures:

a) overgiet de stukjes met voldoende (ongeveer 40 ml) extractiebuffer (aanhangsel 3) en schud 4 uur (bij minder dan 24 °C) dan wel 16-24 uur (gekoeld) in een rondschudapparaat (50-100 rpm),

of

b) homogeniseer de stukjes met voldoende (ongeveer 40 ml) extractiebuffer in een blender (bv. Waring of Ultra Thurax) of door ze fijn te maken in een afgesloten wegwerpbaar maceratiezakje (bv. Stomacher of Bioreba sterk polytheen, 150 mm × 250 mm; d.m.v. straling gesteriliseerd) met een rubberen hamer of geschikte maalapparatuur (bv. Homex).

NB:

Bij gebruik van een blender is er een groot risico op kruisbesmetting tussen de monsters. Neem maatregelen om aërosolvorming en morsen tijdens de extractie te vermijden. Voor elk monster moeten pas gesteriliseerde blendermessen en vaten gebruikt worden. Als de PCR-test wordt gedaan, moet worden vermeden dat er DNA in de containers of maalapparatuur terechtkomt. Aanbevolen wordt om in geval van de PCR-test het materiaal in wegwerpzakken fijn te maken en wegwerpbuizen te gebruiken.

3.1.4. Schenk de bovenstaande vloeistof af. Als de vloeistof erg troebel is, wordt dit verholpen door centrifugeren bij laag toerental (maximaal 180 g gedurende 10 minuten bij een temperatuur van 4-10 °C of vacuümfiltratie (40-100 µm) waarbij het filter met ongeveer 10 ml extractiebuffer (aanhangsel 3) wordt nagespoeld.

3.1.5. Concentreer de bacteriefractie door centrifugeren bij 7 000 g gedurende 15 minuten (of 10 000 g gedurende 10 minuten) bij een temperatuur van 4-10 °C. Verwijder de bovenstaande vloeistof zonder de pellet te verstoren.

3.1.6. Resuspendeer de pellet in 1,5 ml pelletbuffer (aanhangsel 3). Gebruik 500 µl voor *C. m.* ssp. *sepedonicus*, 500 µl voor *Ralstonia solanacearum* en 500 µl voor referentiedoeleinden. Voeg aan het referentie-aliquot van 500 µl en aan het niet-gebruikte analysealiquot steriele glycerol toe tot een eindconcentratie van 10-25 % (V/V), vortex en bewaar tussen –16 en –24 °C (enkele weken) of –68 en –86 °C (enkele maanden). Bewaar de analysealiquots tijdens het onderzoek bij 4-10 °C.

Herhaald invriezen en ontdooien wordt niet aangeraden.

Als het extract moet worden vervoerd, moet het binnen 24 à 48 uur in een koelbox worden afgeleverd.

▼M1

3.1.7. Het is noodzakelijk dat alle positieve controles en monsters van *C. m.* ssp. *sepedonicus* gescheiden behandeld worden om contaminatie te voorkomen. Dit geldt voor de IF-glaasjes en voor alle testen.

3.2. **Aardappelplanten**

NB:

Voor de detectie van latente *C. m.* ssp. *sepedonicus*-populaties wordt aangeraden samengestelde monsters te testen. De methode is goed bruikbaar voor samengestelde monsters van maximaal 200 stengeldelen. (Surveyonderzoeken moeten gebaseerd zijn op een statistisch representatieve steekproef van de onderzochte plantenpopulatie.)

3.2.1. Snijd met een schoon, ontsmet mes of dito snoeischaar een stuk van 1 à 2 cm van het onderste deel van de stengel af, vlak boven het bodemniveau.

Ontsmet de stengeldelen kort met ethanol 70 % en dep ze direct droog met tissuepapier.

Doe de stengeldelen in een gesloten steriele container overeenkomstig de onderstaande bemonsteringsprocedures.

3.2.2. Verwerk de stengeldelen volgens een van de volgende procedures:

a) overgiet de stengeldelen met voldoende (ongeveer 40 ml) extractiebuffer (aanhangsel 3) en schud 4 uur (bij minder dan 24 °C) dan wel 16-24 uur (gekoeld) in een rondschudapparaat (50-100 rpm),

of

b) verwerk de stengeldelen onmiddellijk door ze fijn te maken in een sterk maceratiezakje (bv. Stomacher of Bioreba) met voldoende extractiebuffer (aanhangsel 3) met een rubberen hamer of geschikte maalapparatuur (bv. Homex). Is dit niet mogelijk, dan kunnen zij gekoeld hooguit 72 uur worden bewaard en bij kamertemperatuur hooguit 24 uur.

3.2.3. Laat 15 minuten bezinken en schenk de bovenstaande vloeistof af.

3.2.4. Het is doorgaans niet nodig het extract verder te zuiveren of de bacteriefractie te concentreren; desgewenst kan dit worden gedaan door filtratie en/of centrifugering zoals beschreven onder 3.1.4-3.1.6.

3.2.5. Verdeel het oorspronkelijke of geconcentreerde monsterextract in twee gelijke delen. Houd de ene helft gedurende het onderzoek op 4-10 °C en bewaar de andere helft na toevoeging van 10-25 % (V/V) steriele glycerol tussen –16 en –24 °C (enkele weken) of –68 en –86 °C (enkele maanden) voor het geval verder onderzoek nodig is.

4. IF-TEST

Principe

De IF-test wordt als eerste screeningtest aanbevolen vanwege de aangetoonde robuustheid ten opzichte van de vereiste drempelwaarden.

Wanneer de IF-test als eerste screeningtest gebruikt wordt en de uitslag positief is, moet als tweede screeningtest een PCR- of FISH-test worden gedaan. Wanneer de IF-test als tweede screeningtest gebruikt wordt en de uitslag positief is, moet het stroomdiagram worden gevolgd voor de verdere analysen.

NB:

Gebruik altijd een polyklonaal antilichaam als de IF-test de eerste screeningtest is. Bij een positieve IF-test met een polyklonaal antilichaam kan verder screenen van het monster met een monoklonaal antilichaam de specificiteit verhogen, al kan dit ten koste gaan van de gevoeligheid.

Gebruik antilichamen tegen een referentiestam van *C. m.* ssp. *sepedonicus*. Aanbevolen wordt van elke nieuwe partij antilichamen de titer te bepalen. De titer wordt gedefinieerd als de hoogste verdunning waarbij een optimale reactie optreedt bij het testen van een suspensie met 10^5-10^6 cellen/ml van de homologe stam van *C. m.* ssp. *sepedonicus* met een geschikt fluoresceïne-isothiocyanaat (FITC)-conjugaat, overeenkomstig de aanbevelingen van de fabrikant. De ruwe polyklonale of monoklonale antilichamen moeten een IF-titer hebben van ten minste 1:2 000. Bij het onderzoek moeten de antilichamen worden gebruikt in werkverdunningen rond de titer. Gebruik gevalideerde antilichamen (zie de website: http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

▼**M1**

De test moet worden uitgevoerd op vers bereide monsterextracten. Zo nodig kan de test ook goed worden uitgevoerd op extracten die tussen –68 en –86 °C in glycerol zijn bewaard. De glycerol kan uit het monster worden verwijderd door toevoegen van 1 ml pelletbuffer (aanhangsel 4), centrifugeren bij 7 000 g gedurende 15 minuten en resuspensie in een gelijk volume pelletbuffer. Dit is vaak niet nodig, met name als de monsters op de objectglaasjes worden gefixeerd door ze door de vlam te halen (zie 2.2).

Maak afzonderlijke positieve controleglaasjes van de homologe stam of een andere referentiestam van *C. m.* ssp. *sepedonicus*, gesuspendeerd in aardappelextract, zoals beschreven in aanhangsel 2, en eventueel in buffervloeistof.

Natuurlijk geïnfecteerd weefsel (geconserveerd door vriesdrogen of invriezen bij –16 tot –24 °C) moet zo mogelijk als soortgelijke controle op hetzelfde glaasje worden gebruikt.

Als negatieve controles worden aliquots monsterextract gebruikt waarbij eerdere testen negatief waren.

Gebruik microscoopglaasjes met meerdere venstertjes, bij voorkeur tien venstertjes met een diameter van minstens 6 mm.

Onderzoek het controlemateriaal op dezelfde wijze als de monsters.

4.1. Prepareer de objectglaasjes volgens een van onderstaande procedures:

i) voor pellets met betrekkelijk weinig zetmeelsediment:

Pipetteer een afgemeten standaardvolume (15 µl is genoeg voor een venstertje met een diameter van 6 mm — vergroot het volume voor grotere venstertjes naar rato) van een 1:100-verdunning van de geresuspendeerde aardappelpellet op het eerste venstertje. Pipetteer vervolgens eenzelfde volume onverdunde pellet (1/1) op de resterende venstertjes van de rij. De tweede rij kan worden gebruikt voor duplo's of voor een tweede monster zoals aangegeven in figuur 1.

ii) voor andere pellets:

Maak decimale oplossingen, (1:10 en 1:100) van de geresuspendeerde pellet in pelletbuffer. Pipetteer een afgemeten standaardvolume (15 µl is genoeg voor een venstertje met een diameter van 6 mm — vergroot het volume voor grotere venstertjes naar rato) van de geresuspendeerde pellet en van elke verdunning op een rij venstertjes. De tweede rij kan worden gebruikt voor duplo's of voor een tweede monster zoals aangegeven in figuur 2.

4.2. Laat de druppels bij kamertemperatuur of door verwarming tot 40-45 ° C drogen. Fixeer de bacteriecellen op het glaasje door het te verwarmen (15 minuten op 60 °C), door de vlam te halen, met ethanol 95 % of volgens de specifieke aanwijzingen van de leverancier van de antilichamen.

Zo nodig kunnen de gefixeerde glaasjes hierna bevroren in een doos met droogmiddel bewaard worden voor verder onderzoek (dit mag niet langer dan nodig en hooguit drie maanden duren).

4.3. IF-procedure

i) Bij het prepareren van objectglaasjes volgens 4.1, onder i):

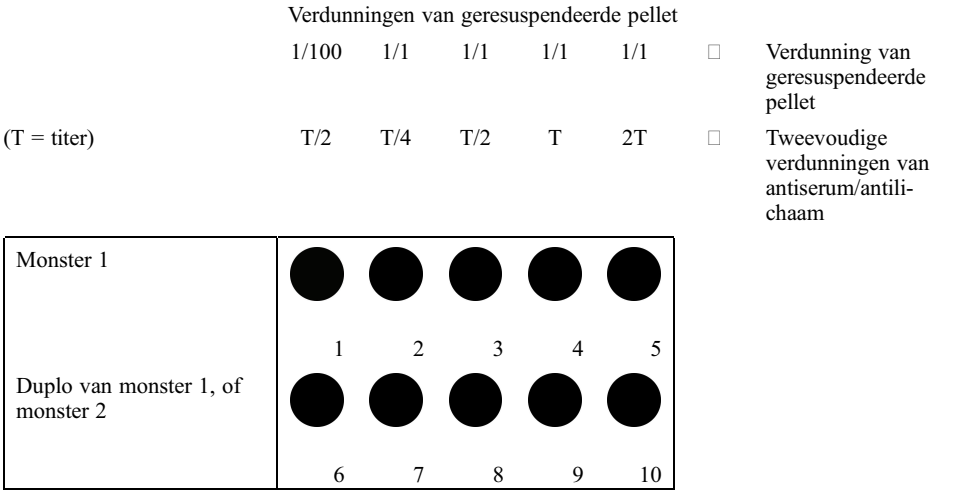
Maak een reeks tweevoudige verdunningen van het antilichaam in IF-buffer. Het eerste venstertje krijgt de helft van de titer (T/2) en de volgende een kwart van de titer (T/4), de helft daarvan (T/2), de titer (T) en tweemaal de titer (2T).

ii) Bij het prepareren van objectglaasjes volgens 4.1, onder ii):

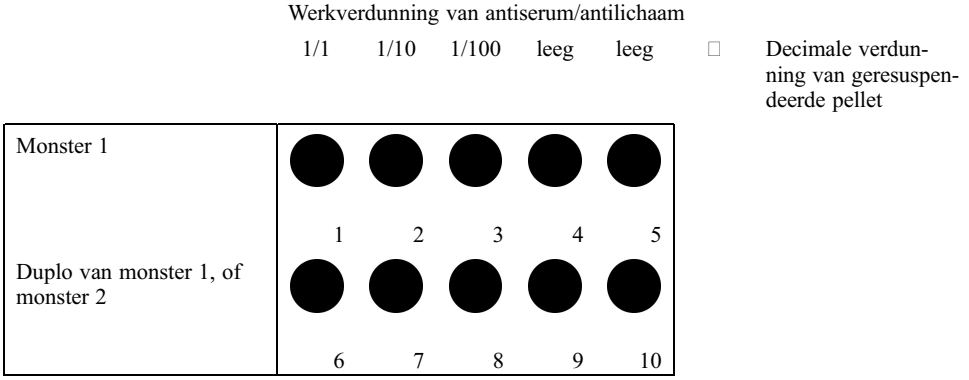
Maak de werkverdunning van het antilichaam aan in IF-buffer. De werkverdunning beïnvloedt de specificiteit.

▼**M1**

Figuur 1. Prepareren van het objectglaasje volgens 4.1, onder i) en 4.3, onder i)



Figuur 2. Prepareren van het objectglaasje volgens 4.1, onder ii) en 4.3, onder ii)



4.3.1. Leg de microscoopglaasjes op vochtig papier. Bedek alle testvenstertjes volledig met de antilichaamverdunning(en). Het op elk venstertje aangebrachte volume antilichaam moet ten minste gelijk zijn aan het volume aangebracht extract.

Wanneer de leverancier van de antilichamen geen specifieke aanwijzingen heeft verstrekt, moet de volgende procedure worden gevolgd.

4.3.2. Incubeer de glaasjes op vochtig papier afgedekt 30 minuten bij kamertemperatuur (18-25 °C).

4.3.3. Schud de druppels van elk glaasje af en spoel de glaasjes zorgvuldig met IF-buffer. Was door onderdompeling 5 minuten in IF-buffer-Tween (aanhangsel 3) en vervolgens 5 minuten in IF-buffer. Vermijd aërosolvorming en druppeloverdracht waardoor kruisbesmetting kan optreden. Verwijder overtollig vocht zorgvuldig door zachtjes af te deppen.

4.3.4. Leg de glaasjes op vochtig papier. Bedek alle venstertjes met de verdunning van het FITC-conjugaat die gebruikt werd om de titer te bepalen. Het op de venstertjes aangebrachte volume conjugaat moet identiek zijn met het volume aangebracht antilichaam.

4.3.5. Incubeer de glaasjes op vochtig papier afgedekt gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur (18-25 °C).

4.3.6. Schud de druppels conjugaat van het glaasje af. Spoel af en was als voorheen (punt 4.3.3).

Verwijder overtollig vocht zorgvuldig.

4.3.7. Pipetteer 5-10 µl van 0,1 M fosfaatgebufferde glycerol (aanhangsel 3), of een commercieel verkrijgbaar antifading inbedmiddel, op elk venstertje en breng een dekglaasje aan.

▼**M1**

4.4. Aflezen van de IF-test

4.4.1. Beoordeel de glaasjes met een epifluorescentiemicroscoop die voorzien is van geschikte filters voor excitatie van FITC. Gebruik een geschikt olie- of water-immersieobjectief voor een totale vergroting van 500-1 000 ×. Bekijk de venstertjes langs twee diameters in een rechte hoek en rond de omtrek. Onderzoek bij monsters zonder of met een gering aantal cellen ten minste 40 microscoopvelden.

Onderzoek eerst het positieve controleglaasje. De cellen moeten helder fluorescerend en volledig gekleurd zijn bij de bepaalde antilichaamtiter of werkverdunning. De IF-test (deel 4) moet herhaald worden bij afwijkende kleuring.

4.4.2. Kijk vervolgens in de testvenstertjes van de objectglaasjes uit naar helder fluorescerende cellen met een voor *C. m.* ssp. *sepedonicus* kenmerkende morfologie (zie de website: http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). De intensiteit van de fluorescentie moet gelijkwaardig zijn aan, of beter dan, die van de positieve controlestam bij dezelfde antilichaamverdunning. Cellen met onvolledige kleuring of met een zwakke fluorescentie moeten genegeerd worden.

Als contaminatie wordt vermoed, moet de test herhaald worden. Dit kan het geval zijn als alle glaasjes in een partij positieve cellen vertonen doordat de buffer gecontamineerd is, of als er positieve cellen worden aangetroffen op de coating van het glaasje buiten de venstertjes.

4.4.3. Aan de immunofluorescentietest zijn verschillende problemen verbonden wat de specificiteit betreft. In pellets van naveleindstukjes en stengeldelen van aardappel worden vaak achtergrondpopulaties van fluorescerende cellen met atypische morfologie en kruisreagerende saprofytische bacteriën gevonden die qua grootte en morfologie lijken op *C. m.* ssp. *sepedonicus*.

4.4.4. Besteed alleen aandacht aan fluorescerende cellen met een karakteristieke grootte en morfologie bij de titer of werkverdunning van de antilichamen zoals aangegeven in punt 4.3.

4.4.5. Interpretatie van de IF-test

i) Wanneer er helder fluorescerende cellen met een karakteristieke morfologie worden aangetroffen, bepaal dan het gemiddelde aantal typische cellen per microscoopveld en bereken het aantal typische cellen per ml geresuspendeerde pellet (aanhangsel 4).

De IF-uitslag is positief als het monster ten minste 5×10^3 typische cellen per ml geresuspendeerde pellet bevat. Het monster wordt als mogelijk besmet aangemerkt en moet nader onderzocht worden.

ii) De IF-test is negatief als het monster minder dan 5×10^3 cellen per ml geresuspendeerde pellet bevat; het monster wordt als negatief aangemerkt. Verder onderzoek is dan niet nodig.

5. FISH-TEST

Principe

Wanneer de FISH-test als eerste screeningtest gebruikt wordt en de uitslag positief is, moet als tweede verplichte screeningtest een IF-test worden gedaan. Wanneer de FISH-test als tweede screeningtest gebruikt wordt en de uitslag positief is, moet het stroomdiagram worden gevolgd om de diagnose af te ronden.

NB:

Gebruik gevalideerde *C. m.* ssp. *sepedonicus*-specifieke oligo-probes (aanhangsel 7). Bij de voorbereidende testen met deze methode moeten minstens 10^3-10^4 cellen van *C. m.* ssp. *sepedonicus* per ml, toegevoegd aan monsterextracten waarbij een eerdere test negatief was, reproduceerbaar gedetecteerd kunnen worden.

De onderstaande procedure wordt bij voorkeur uitgevoerd op vers bereid monsterextract maar kan ook goed worden uitgevoerd op monsterextract dat in glycerol bewaard is tussen –16 en –24 °C of –68 en –86 °C.

Als negatieve controles worden aliquots monsterextract gebruikt waarbij eerdere testen op *C. m.* ssp. *sepedonicus* negatief waren.

Als positieve controles worden suspensies bereid met 10^5-10^6 cellen/ml van *C. m.* ssp. *sepedonicus* (bv. stam NCPPB 4053 of PD 406) in 0,01 M fosfaatbuffer (PB) van een drie- tot vijfdaagse cultuur (voor de bereiding zie aanhangsel 2). Maak afzonderlijke positieve controle-

▼M1

glaasjes van de homologe stam of een andere referentiestam van *C. m.* ssp. *sepedonicus*, gesuspendeerd in aardappelextract, zoals beschreven in aanhangsel 2.

Het gebruik van de FITC-gelabelde eubacteriële oligo-probe kan als controle voor het hybridisatieproces dienen, omdat hierdoor alle eubacteriën in het monster worden gekleurd.

Onderzoek het controlemateriaal op dezelfde wijze als de monsters.

5.1. **Fixatie van het aardappelextract**

Het volgende protocol is gebaseerd op Wullings e.a., (1998):

5.1.1. Bereid het fixatief (aanhangsel 7).

5.1.2. Pipetteer 100 µl van elk monsterextract in een eppendorfbuisje en centrifugeer 8 minuten bij 7 000 g.

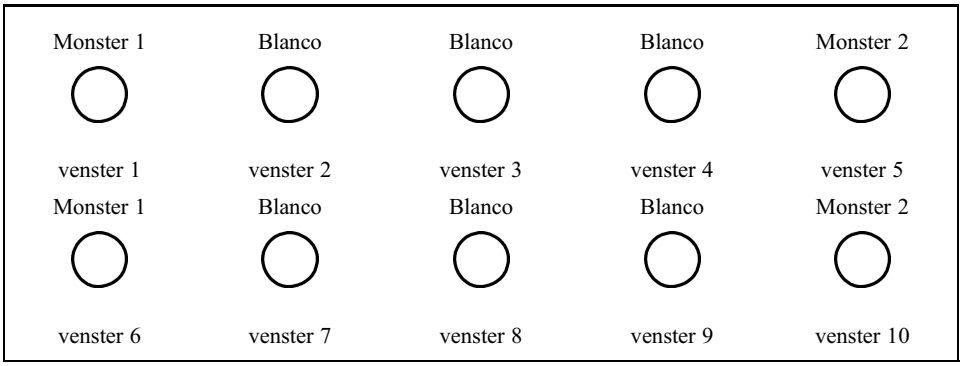
5.1.3. Verwijder de bovenstaande vloeistof en los de pellet op in 500 µl korter dan 24 uur tevoren bereid fixatief. Vortex en incubeer overnacht bij 4 °C.

Een alternatief fixatief is ethanol 96 %. In dat geval wordt de pellet van punt 5.1.2. opgelost in 50 µl 0,01 M fosfaatbuffer en 50 µl ethanol 96 %. Vortex en incubeer 30-60 minuten bij 4 °C.

5.1.4. Centrifugeer 8 minuten bij 7 000 g, schenk de bovenstaande vloeistof af en resuspendeer de pellet in 75 µl 0,01 M PB (zie aanhangsel 3).

5.1.5. Breng 16 µl van de gefixeerde suspensies op een schoon objectglaasje met venstertjes zoals aangegeven in figuur 3. Breng twee verschillende monsters op het glaasje, onverdund en in een 1:100-verdunning (gebruik hiervoor 10 µl in 0,01 M PB). De resterende monsteroplossing (49 µl) kan na toevoeging van eenzelfde volume ethanol 96 % bij –20 °C worden bewaard. Als de FISH-test herhaald moet worden, wordt de ethanol door centrifugeren verwijderd en een gelijk deel 0,01 M PB toegevoegd en door vortexen gemengd.

Figuur 3. Overzicht van het FISH-glaasje



5.1.6. Droog de glaasjes aan de lucht (of op een droger bij 37 °C) en fixeer ze door ze door de vlam te halen.

Op dit punt kan de procedure worden onderbroken om de volgende dag verder te gaan met de hybridisatie. De objectglaasjes moeten stofvrij en droog bij kamertemperatuur worden bewaard.

5.2. **Prehybridisatie en hybridisatie**

5.2.1. Bereid een oplossing van 10 mg lysozym (Sigma L-6876) in 10 ml water (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0). Deze oplossing kan worden bewaard, maar mag niet meer dan één keer worden bevroren en ontdooid. Bedek elk venstertje met ongeveer 50 µl lysozym-oplossing en incubeer gedurende 10 minuten bij kamertemperatuur. Dompel de glaasjes vervolgens eenmaal in gedemineraliseerd water en dep ze droog met filtreerpapier.

In plaats van lysozym kan ook 50 µl van een oplossing van 40-400 µg ml^{-1} proteïnase K in buffer (20 mM Tris-HCl, 2 mM $CaCl_2$, pH 7,4) op elk venstertje worden aangebracht, waarna 30 minuten bij 37 °C wordt geïncubeerd.

5.2.2. Dehydrateer de cellen in een ethanolreeks (50 %, 80 %, 96 %, telkens 1 minuut). Droog de glaasjes aan de lucht in een houder.

▼M1

5.2.3. Maak een vochtige incubatiekamer door de bodem van een luchtdicht vat te bedekken met tissue- of filtreerpapier, doordrenkt met 1x hybmix (aanhangsel 7). Pre-incubeer het vat in de hybridisatieoven gedurende ten minste 10 minuten bij 55 °C.

5.2.4. Bereid de hybridisatieoplossing (aanhangsel 7), reken 45 µl per glaasje, en pre-incubeer 5 minuten bij 55 °C.

5.2.5. Plaats de glaasjes op een op 45 °C ingestelde verwarmingsplaat en breng 10 µl hybridisatieoplossing aan op elk van de vier venstertjes op het glaasje of de glaasjes.

5.2.6. Breng twee dekglaasjes (24 × 24 mm) op elk objectglaasje aan zonder lucht in te sluiten. Plaats de objectglaasjes in de voorverwarmde incubatiekamer en hybridiseer overnacht in de oven in het donker bij 55 ° C.

5.2.7. Bereid drie bekerglazen met 1 l ultrazuiver water (UPW), 1 l 1x hybmix (334 ml 3x hybmix en 666 ml UPW) en 1 l 1/2x hybmix (167 ml 3x hybmix en 833 ml UPW). Pre-incubeer elk bekerglas in een waterbad bij 55 °C.

5.2.8. Verwijder de dekglaasjes van de objectglaasjes en plaats de objectglaasjes in een houder.

5.2.9. Verwijder de overmaat probe door 15 minuten bij 55 °C te incuberen in het bekerglas met 1x hybmix.

5.2.10. Plaats de houder in de 1/2x hybmix wasoplossing en incubeer nogmaals 15 minuten.

5.2.11. Dompel de objectglaasjes even in UPW en leg ze op filtreerpapier. Verwijder overtollige vloeistof door het oppervlak voorzichtig met filtreerpapier te bedekken. Pipetteer 5-10 µl antifading inbedmiddel (bv. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA of gelijkwaardig) op elk venstertje en plaats een groot dekglaasje (24 × 60 mm) op het objectglaasje.

5.3. **Aflezen van de FISH-test**

5.3.1. Beoordeel de objectglaasjes onmiddellijk met een microscoop die geschikt is voor epifluorescentiemicroscopie bij een vergroting van 630 of 1000x en olie-immersie. Met een filter dat geschikt is voor fluoresceïne-isothiocyanaat (FITC) lichten eubacteriële cellen (waaronder de meeste gramnegatieve cellen) in het monster groen op. Met een filter voor tetramethylrodamine-5-isothiocyanaat lichten Cy3-gekleurde cellen van *C. m.* ssp. *sepedonicus* rood op. Vergelijk de celmorfologie met die van de positieve controles. De cellen moeten helder fluoresceren en volledig gekleurd zijn. De FISH-test (deel 9.4) moet herhaald worden bij afwijkende kleuring. Bekijk de venstertjes langs twee diameters in een rechte hoek en rond de omtrek. Onderzoek bij monsters zonder of met een gering aantal cellen ten minste 40 microscoopvelden.

5.3.2. Kijk vervolgens in de testvenstertjes van de objectglaasjes uit naar helder fluorescerende cellen met een voor *C. m.* ssp. *sepedonicus* kenmerkende morfologie (zie de website: http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). De intensiteit van de fluorescentie moet gelijkwaardig zijn aan, of beter dan, die van de positieve controlestam. Cellen met onvolledige kleuring of met een zwakke fluorescentie moeten genegeerd worden.

5.3.3. Als contaminatie wordt vermoed, moet de test herhaald worden. Dit kan het geval zijn als alle glaasjes in een partij positieve cellen vertonen doordat de buffer gecontamineerd is, of als er positieve cellen worden aangetroffen op de coating van het glaasje buiten de venstertjes.

5.3.4. Aan de FISH-test zijn verschillende problemen verbonden wat de specificiteit betreft. In pellets van naveleindstukjes en stengeldelen van aardappel worden soms, maar veel minder vaak dan bij de IF-test, achtergrondpopulaties van fluorescerende cellen met atypische morfologie en kruisreagerende saprofytische bacteriën gevonden die qua grootte en morfologie lijken op *C. m.* ssp. *sepedonicus*.

5.3.5. Besteed alleen aandacht aan fluorescerende cellen met een karakteristieke grootte en morfologie, zie punt 5.3.2.

5.3.6. Interpretatie van het resultaat van de FISH-test

i) De resultaten van de FISH-test zijn valide als, in alle positieve controles en in geen van de negatieve controles, met het FITC-filter heldergroen fluorescerende cellen met een voor *C. m.* ssp.

▼M1

sepedonicus karakteristieke grootte en morfologie worden waargenomen en met het rodaminefilter helderrood fluorescerende cellen. Wanneer er helder fluorescerende cellen met een karakteristieke morfologie worden aangetroffen, bepaal dan het gemiddelde aantal typische cellen per microscoopveld en bereken het aantal typische cellen per ml geresuspendeerde pellet (aanhangsel 4). Monsters met ten minste 5×10^3 typische cellen per ml geresuspendeerde pellet worden als mogelijk besmet aangemerkt. Er is dan verder onderzoek nodig. Monsters met minder dan 5×10^3 typische cellen per ml geresuspendeerde pellet worden als negatief aangemerkt.

ii) De FISH-test is negatief als met het rodaminefilter geen helderrood fluorescerende cellen die karakteristiek zijn voor *C. m.* ssp. *sepedonicus*, mits die wel met dat filter in de positieve controlepreparaten zijn waargenomen.

6. PCR-TEST

Principe

Wanneer de PCR-test als eerste screeningtest gebruikt wordt en de uitslag positief is, moet als tweede verplichte screeningtest een IF-test worden gedaan. Wanneer de PCR-test als tweede screeningtest gebruikt wordt en de uitslag positief is, moet het stroomdiagram worden gevolgd om de diagnose af te ronden.

Het wordt aangeraden deze methode alleen algemeen als eerste screeningtest te gebruiken als er voldoende gespecialiseerde ervaring mee is opgedaan.

NB:

Bij de voorbereidende testen met deze methode moeten 10^3-10^4 cellen van *C. m.* ssp. *sepedonicus* per ml, toegevoegd aan monsterextracten waarbij een eerdere test negatief was, reproduceerbaar gedetecteerd kunnen worden. Er kunnen optimalisatieproeven nodig zijn om in alle laboratoria een maximale gevoeligheid en specificiteit te bereiken.

Gebruik gevalideerde PCR-reagentia en -protocollen. Kies bij voorkeur een methode met een interne controle.

Neem de nodige voorzorgen om contaminatie van het monster met doel-DNA te vermijden. De PCR-test moet worden uitgevoerd door ervaren analisten in speciale moleculair-biologische laboratoria om de kans op contaminatie met doel-DNA tot een minimum te beperken.

Negatieve controles (bij de DNA-extractie en de PCR-procedure) moeten altijd op dezelfde wijze worden behandeld als de uiteindelijke monsters, om na te gaan of er verontreiniging met DNA is opgetreden.

In de PCR-test moeten de volgende negatieve controles worden meegenomen:

— monsterextract waarbij een eerdere test op *C. m.* ssp. *sepedonicus* negatief was;

— controles met de buffer die bij de extractie van de bacterie en het DNA uit het monster is gebruikt;

— PCR-reactiemix.

Als positieve controles moeten worden genomen:

— aliquots van geresuspendeerde pellets waaraan *C. m.* ssp. *sepedonicus* is toegevoegd (voor de bereiding zie aanhangsel 2);

— een suspensie van 10^6 cellen/ml van *C. m.* ssp. *sepedonicus* in water uit een virulent isolaat (bv. NCPPB 2140 of NCPPB 4053);

— gebruik zo mogelijk ook DNA dat is geëxtraheerd uit positieve controlemonsters in de PCR-test.

Om contaminatie te vermijden moeten de positieve controles in een andere ruimte worden bereid dan de analysemonsters.

De monsterextracten moeten zo veel mogelijk vrij van grond zijn. Het kan dus soms raadzaam zijn om extracten uit gewassen aardappelen te bereiden als er PCR-protocollen gebruikt zullen worden.

6.1. **DNA-zuiveringsmethoden**

Maak gebruik van positieve en negatieve controlemonsters zoals hierboven beschreven.

Bereid het controlemateriaal op precies dezelfde wijze als monstermateriaal.

▼M1

Er zijn diverse methoden beschikbaar voor het zuiveren van doel-DNA uit complexe monstersubstraten, waarbij remmers van de PCR en andere enzymatische reacties worden verwijderd en het doel-DNA in het monsterextract wordt geconcentreerd.

De volgende methode is geoptimaliseerd voor gebruik met de gevalideerde PCR-methode als beschreven in aanhangsel 6.

6.1.a) Methode volgens Pastrik (2000)

1. Pipetteer 220 µl lysisbuffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) in een eppendorfbuisje van 1,5 ml.
2. Voeg 100 µl monsterextract toe en plaats het buisje 10 minuten in een verwarmingsblok of waterbad op 95 °C.
3. Koel het buisje 5 minuten op ijs.
4. Voeg 80 µl lysozym-voorraadoplossing (50 mg lysozym per ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) toe en incubeer 30 minuten bij 37 °C.
5. Voeg 220 µl Easy DNA® solution A (Invitrogen) toe, vortex grondig en incubeer 30 minuten bij 65 °C.
6. Voeg 100 µl Easy DNA® solution B (Invitrogen), vortex krachtig tot het neerslag vrij in het buisje beweegt en het monster gelijkmatig viskeus is.
7. Voeg 500 µl chloroform toe en vortex tot de viscositeit afneemt en het mengsel homogeen is.
8. Centrifugeer 20 minuten bij 15 000 g en 4 °C om de fasen te scheiden en de interfase te vormen.
9. Breng de bovenste fase over in een schoon eppendorfbuisje.
10. Voeg 1 ml ethanol 100 % (–20 °C) toe, vortex kort en incubeer 10 minuten op ijs.
11. Centrifugeer 20 minuten bij 15 000 g en 4 °C en verwijder de ethanol van de pellet.
12. Voeg 500 µl ethanol 80 % (–20 °C) en meng door het buisje om te keren.
13. Centrifugeer 10 minuten bij 15 000 g en 4 °C, bewaar de pellet en verwijder de ethanol.
14. Droog de pellet aan de lucht of in een DNA Speed Vac.
15. Resuspendeer de pellet in 100 µl steriel UPW en laat minstens 20 minuten bij kamertemperatuur staan.
16. Bewaar bij –20 °C voor de PCR.
17. Draai eventueel aanwezig wit neerslag af in een centrifuge en gebruik 5 µl van de bovenstaande vloeistof, die het DNA bevat, voor de PCR.

6.1.b) Andere methoden

Er kunnen andere DNA-extractiemethoden (bv. Qiagen DNeasy Plant Kit) worden gebruikt, mits die even doeltreffend blijken te zijn bij het zuiveren van DNA uit controlemonsters met 10^3-10^4 pathogene cellen/ml.

6.2. **PCR**

6.2.1. Bereid analyse- en controletemplates voor de PCR volgens het gevalideerde protocol (aanhangsel 6). Bereid een tienvoudige verdunning van monster-DNA-extract (1:10 in UPW).

6.2.2. Bereid de geschikte PCR-reactiemix in een contaminatievrije omgeving volgens het gepubliceerde protocol (aanhangsel 6). Het gevalideerde PCR-protocol is een multiplexreactie die ook een interne PCR-controle omvat.

6.2.3. Voeg 5 µl DNA-extract per 25 µl PCR-reactiemix in steriele PCR-buisjes.

6.2.4. Neem ook een negatief controlemonster mee met alleen PCR-reactiemix; voeg hieraan in plaats van het monster UPW toe uit dezelfde bron als in de PCR-mix is gebruikt.

6.2.5. Plaats de buisjes in hetzelfde PCR-apparaat als voor de voorbereidende testen is gebruikt en werk het geoptimaliseerde PCR-programma af (aanhangsel 6).

▼M1

6.3. **Analyse van het PCR-product**

6.3.1. Scheid de amplicons met behulp van agarosegelelektroforese. Laat minimaal 12 µl geamplificeerd DNA-reactiemengsel van elk monster, gemengd met 3 µl laadbuffer (aanhangsel 6) lopen in 2,0 % (m/V) agarosegels in TAE-buffer (Tris-acetaat-EDTA, aanhangsel 6) bij 5-8 V/cm. Gebruik een geschikte DNA-marker, bv. 100 bp ladder.

6.3.2. Maak de DNA-banden zichtbaar door kleuren met ethidiumbromide (0,5 mg/l) gedurende 30-45 minuten. *Deze stof is mutageen — neem de nodige voorzorgen in acht.*

6.3.3. Onderzoek de gekleurde gel door transilluminatie met kortgolvig UV (bv. λ = 302 nm) op geamplificeerde PCR-producten van de verwachte lengte (aanhangsel 6) en leg het resultaat vast.

6.3.4. Ga bij alle nieuwe bevindingen/gevallen na of het PCR-amplicon authentiek is met behulp van een restrictie-enzymanalyse op een monster van het resterende geamplificeerde DNA door dat bij de optimale temperatuur en gedurende de optimale tijd met een geschikt enzym en geschikte buffer (zie aanhangsel 6) te incuberen. Scheid de verkregen fragmenten met behulp van agarosegelelektroforese zoals hierboven beschreven; bekijk het karakteristieke restrictiefragmentenpatroon onder UV-transilluminatie na kleuring met ethidiumbromide en vergelijk dit met de niet-gedigesteerde en de gedigesteerde positieve controle.

Interpretatie van het resultaat van de PCR-test:

De PCR-test is negatief als er geen *C. m.* ssp. *sepedonicus*-specifiek PCR-amplicon van de verwachte lengte wordt aangetroffen in het analysemonster, maar wel in alle positieve controlemonsters (bij multiplex-PCR met plantspecifieke interne controleprimers moet er een tweede PCR-product van de verwachte lengte met het analysemonster geamplificeerd zijn).

De PCR-test is positief als het *C. m.* ssp. *sepedonicus*-specifieke PCR-amplicon van de verwachte lengte en met het verwachte restrictiepatroon (indien nodig) wordt aangetoond, mits dit niet in een van de negatieve controlemonsters geamplificeerd is. Een positief resultaat kan ook op betrouwbare wijze worden bevestigd door de test met een tweede set PCR-primers te herhalen (deel 9.3).

NB:

Als het verwachte amplicon wel bij het positieve controlemonster met *C. m.* ssp. *sepedonicus* in water wordt verkregen, maar niet bij de positieve controles met *C. m.* ssp. *sepedonicus* in aardappelextract, is remming van de PCR waarschijnlijk de oorzaak. Bij multiplex-PCR-protocollen met interne PCR-controles is er waarschijnlijk sprake van remming als geen van beide amplicons worden verkregen.

Er moet aan contaminatie worden gedacht als het verwachte amplicon in een of meer van de negatieve controles wordt gevonden.

7. BIOASSAY

NB:

Bij de voorbereidende testen met deze methode moeten 10^3-10^4 kolonievormende eenheden van *C. m.* ssp. *sepedonicus* per ml, die zijn toegevoegd aan monsterextracten waarbij een eerdere test negatief was, reproduceerbaar gedetecteerd kunnen worden (voor de bereiding zie aanhangsel 2).

De grootste detectiegevoeligheid wordt verkregen met vers bereid monsterextract en optimale groeicondities. De methode kan echter ook goed worden toegepast op extracten die tussen –68 en –86 °C in glycerol zijn bewaard.

Sommige auberginerassen vormen een voortreffelijk selectief ophopingsmedium voor de groei van *C. m.* ssp. *sepedonicus*, ook als er geen symptomen aanwezig zijn, en kunnen goed dienst doen voor een bevestigingstest op waardplanten.

De groeicondities moeten optimaal zijn om de kans op fout-negatieve testuitslagen tot een minimum te beperken.

Voor nadere bijzonderheden over het kweken zie aanhangsel 8.

7.1. Verdeel het resterende analysealiquot van de geresuspendeerde pellet van deel 3.1.6 of 3.2.5 in zijn geheel over een aantal aubergines volgens een van de hierna beschreven methoden (7.3 of 7.4). Gebruik alleen planten in het 2- tot volgroeid 3-bladstadium. Om de geresus-

▼M1

pendeerde pellet helemaal te gebruiken en de inoculatie doeltreffend te laten verlopen, zijn voor de onderstaande procedures per monster 15-25 aubergineplanten nodig.

7.2. Geef de aubergines een à twee dagen vóór de inoculatie geen water om de turgor te verminderen.

7.3. Snede-inoculatie

7.3.1. Houd de plant tussen twee vingers en pipetteer een druppel (ongeveer 5-10 µl) van de gesuspendeerde pellet op de stengel tussen de zaadlobben en het eerste blad.

7.3.2. Maak met een steriel scalpel vanaf de pelletdruppel een diagonale snede van ongeveer 1,0 cm lang en ongeveer 2/3 van de stengeldikte diep.

7.3.3. Stop de snede dicht met steriele vaseline uit een injectiespuit.

7.4. Injectie-inoculatie

Inoculeer de auberginestengels net boven de zaadlobben met een injectiespuit voorzien van een hypodermische naald (minimaal 23G). Verdeel het monster over de aubergines.

7.5. Inoculeer met behulp van dezelfde methode (7.3 of 7.4) vijf planten als positieve controles met een waterige suspensie van 10^5-10^6 cellen/ml van een bekende cultuur van *C. m.* ssp. *sepedonicus* en zo mogelijk met natuurlijk geïnfecteerd knolweefsel (zie deel 4).

7.6. Inoculeer volgens dezelfde methode (7.3 of 7.4) vijf planten als negatieve controles met steriele pelletbuffer.

7.7. Incubeer de planten onder quarantaineomstandigheden maximaal vier weken bij 18-24 °C. Zorg tijdens de incubatie voor voldoende licht, een hoge vochtigheidsgraad (70-80 %) en adequate bewatering waarbij verzadiging met water of verwelking door watergebrek wordt voorkomen. De cellen van *C. m.* ssp. *sepedonicus* sterven boven 30 °C af; de optimale groeitemperatuur is 21 °C. Incubeer positieve en negatieve controleplanten op van elkaar gescheiden plaatsen in een broeikas of groeikamer om contaminatie te vermijden; is dat wegens ruimtegebrek niet mogelijk, zorg er dan voor dat de verschillende behandelingen strikt gescheiden gehouden worden. Als planten met verschillende monsters dicht bij elkaar geïncubeerd moeten worden, moeten zij met behulp van schermen gescheiden gehouden worden. Bij het bemesten, bewateren, onderzoeken en alle overige handelingen moet de uiterste zorg in acht genomen worden om kruisbesmetting te vermijden. De kassen en groeikamers moeten absoluut vrij van alle schadelijke insecten gehouden worden, aangezien die de bacterie van het ene monster naar het andere kunnen overbrengen.

7.8. Begin na een week regelmatig naar symptomen te zoeken. Tel het aantal planten met symptomen. *C. m.* ssp. *sepedonicus* doet aubergine-bladeren verwelken; dit kan beginnen als een verslapping van de bladranden of tussen de nerven. Verwelkt weefsel kan eerst donkergroen of gevlekt zijn, maar verbleekt voordat het necrotisch wordt. Verwelkte plekken tussen de nerven zien er vaak vettig en doorweekt uit. Necrotisch weefsel heeft vaak een heldergele rand. De planten gaan niet altijd dood; hoe langer het duurt voordat de symptomen zich voordoen, des te groter de overlevingskans. De planten kunnen over de infectie heen groeien. Jonge aubergines zijn veel vatbaarder voor lage populaties *C. m.* ssp. *sepedonicus* dan oudere planten; vandaar de noodzaak om planten in of net vóór het 3-bladstadium te gebruiken.

Verwelking kan ook veroorzaakt worden door populaties van andere bacteriën of schimmels in de pellet van knolweefsel. Dit zijn bijvoorbeeld *Ralstonia solanacearum, Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* en *E. carotovora* ssp. *atroseptica, Erwinia chrysanthemi, Phoma exigua* var. *foveata*, alsmede grote populaties saprofytische bacteriën. Met name kan *Erwinia chrysanthemi* bladsymptomen en verwelking veroorzaken die grote overeenkomst vertonen met de symptomen van *C. m.* ssp. *sepedonicus*. Het enige verschil is dat bij infectie met *Erwinia chrysanthemi* de stengels zwart worden. Andere verwelkingen onderscheiden zich van die veroorzaakt door *C. m.* ssp. *sepedonicus* doordat hele bladeren of hele planten snel verwelken. Ook kan een gramkleuring worden uitgevoerd, waarmee *C. m.* ssp. *sepedonicus* van *Erwinia* spp. kan worden onderscheiden.

7.9. Zodra de symptomen bij de aubergines worden waargenomen, moet getracht worden de bacterie weer te isoleren uit delen verwelkt bladweefsel of stengelweefsel van de planten (zie punt 3.1.3 voor de maceratie van weefsel). Ontsmet de oppervlakte van de auberginebla-

▼M1

deren en stengels door ze met ethanol 70 % af te vegen. Voer een IF- of PCR-test uit op sap van de aubergine en isoleer op geschikte (selectieve) media (zie deel 8). Ook kan een gramkleuring (aanhangsel 9) worden uitgevoerd. Identificeer reinculturen van vermoedelijke *C. m.* ssp. *sepedonicus* en bevestig de pathogeniteit (zie deel 9 en 10).

7.10. In bepaalde gevallen, met name wanneer de groeiomstandigheden niet optimaal zijn, kan *C. m.* ssp. *sepedonicus* zelfs na vier weken incuberen nog als latente infectie in aubergines voorkomen. Als na vier weken geen symptomen zijn waargenomen, voer dan een IF- of PCR-test uit op een samengesteld monster van stengeldelen van 1 cm lang van elke testplant, die boven de inoculatieplaats zijn afgesneden. Als de test positief is, moet de bacterie opnieuw geïsoleerd worden op geschikte (selectieve) media volgens de in deel 8 beschreven procedure. Identificeer reinculturen van vermoedelijke *C. m.* ssp. *sepedonicus* en bevestig de pathogeniteit (zie deel 9 en 10).

Interpretatie van het resultaat van de bioassay:

De met de bioassay verkregen resultaten zijn valide als de planten van de positieve controle karakteristieke symptomen vertonen, de bacteriën weer uit deze planten geïsoleerd kunnen worden en op de negatieve controles geen symptomen worden gevonden.

De bioassay is negatief indien de proefplanten niet met *C. m.* ssp. *sepedonicus* besmet blijken te zijn en *C. m.* ssp. *sepedonicus* wel in de positieve controles wordt gedetecteerd.

De bioassay is positief indien de proefplanten wel met *C. m.* ssp. *sepedonicus* besmet zijn.

8. ISOLATIE VAN *C. M.* SSP. *SEPEDONICUS*

NB:

De diagnose is pas compleet als *C. m.* ssp. *sepedonicus* geïsoleerd, geïdentificeerd (zie deel 9) en door middel van een pathogeniteitstest (deel 10) bevestigd is. Hoewel *C. m.* ssp. *sepedonicus* een moeilijk kweekbaar organisme is, kan het geïsoleerd worden uit weefsel dat de symptomen vertoont.

C. m. ssp. *sepedonicus* kan echter overwoekerd worden door snelgroeiende saprofytische bacteriën en daarom wordt niet aanbevolen hem rechtstreeks uit de pellet van knol- of stengelweefsel (punt 3.1.6 of 3.2.5) te isoleren. Met een selectief medium en een adequate verdunning van de geresuspendeerde pellet van de naveleindstukjes of stengels van aardappelen kan *C. m.* ssp. *sepedonicus* in principe wel direct geïsoleerd worden.

De isolatie moet worden uitgevoerd bij alle symptomatische aardappelknollen of stengeldelen en bij aubergines die geen symptomen vertonen maar waarbij de IF/PCR-test van het samengestelde monster positief was (zie deel 7.10). Zo nodig moeten auberginestengels worden gemacereerd overeenkomstig punt 3.1.3.

Als positieve controles moeten decimale verdunningen van een suspensie van 10^6 kve/ml van *C. m.* ssp. *sepedonicus* (bv. NCPPB 4053 of PD 406) worden bereid. Om contaminatie uit te sluiten moeten de positieve controles volledig gescheiden van de analysemonsters worden bereid.

Voor elke nieuw bereide charge van een selectief medium moet worden nagegaan of die geschikt is voor het kweken van de bacterie voordat hij voor het testen van routinemonsters wordt gebruikt.

Onderzoek het controlemateriaal op dezelfde wijze als de monsters.

8.1. **Selectieve uitplating**

8.1.1. Bereid van een aliquot van 100 µl van een geresuspendeerde aardappelpellet of plantensap van de aubergines decimale verdunningen in pelletbuffer (aanhangsel 3).

8.1.2. Isolatie uit onverdunde aardappelpellet lukt meestal niet omdat *C. m.* ssp. *sepedonicus* zo lastig te kweken is en er concurrentie door saprofyten optreedt. Aangezien de bacterie in geïnfecteerd weefsel gewoonlijk in grote aantallen aanwezig is, kunnen de saprofyten meestal worden uitverdund terwijl het pathogeen achterblijft. Daarom wordt aanbevolen 100 µl van elk van de monsters, verdunning 1:100 tot en met 1:10 000 op MTNA of NCP-88 (aanhangsel 5) (bij gebruik van petrischalen met een diameter van 90 mm — bij andere afmetingen het volume aanpassen) met een drigalski-spatel uit te spatelen op een strijkplaat.

▼M1

NB:

Een andere mogelijkheid is de oorspronkelijke 100 µl aardappelpellet-aliquot met een spatel op een eerste agarplaat uit te strijken en het op de spatel achtergebleven materiaal op een tweede plaat uit te spatelen; dit wordt dan nog eens met een derde plaat gedaan, zodat door het uitspatelen een verdunningseffect wordt verkregen.

8.1.3. Incubeer de platen in het donker bij 21-23 °C.

8.1.4. Na drie dagen worden de platen voor het eerst beoordeeld, waarbij op *C. m.* ssp. *sepedonicus* lijkende kolonies worden geteld, met de controleplaten als vergelijking; de tellingen worden na vijf, zeven en tien dagen herhaald.

8.2. **Reinkweken van verdachte kolonies**

NB:

Subculturen van *C. m.* ssp. *sepedonicus*-achtige kolonies moeten op YGM-media worden gekweekt voor de inoculatie van aubergines en/of de identificatie; dit moet worden gedaan voordat de platen te vol worden, dat wil zeggen bij voorkeur na drie tot vijf dagen.

8.2.1. Strijk *C. m.* ssp. *sepedonicus*-achtige kolonies uit op een van de volgende media (voor de samenstelling zie aanhangsel 5):

nutriënt-dextroseagar (alleen voor subcultuur);

gist-pepton-glucoseagar;

gistextract-minerale-zoutenagar.

Incubeer tot tien dagen bij 21-24 °C.

C. m. ssp. *sepedonicus* groeit langzaam en brengt meestal binnen tien dagen minuscule, crèmekleurige, koepelvormige kolonies voort. Voor foto's van karakteristieke kolonies van *C. m.* ssp. *Sepedonicus*, zie de website: http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main.

8.2.2. Strijk opnieuw uit om een reincultuur te krijgen.

De groeisnelheden wordt beter met een subcultuur. Karakteristieke kolonies zijn roomwit of ivoorkleurig, soms geel, afgerond, glad, hoog, convex, slijmachtig-vloeibaar, hebben gave randen en zijn gewoonlijk 1-3 mm in diameter.

Een eenvoudige gramkleuring (aanhangsel 9) kan de keuze van de kolonies voor verder onderzoek gemakkelijker maken.

8.2.3. Identificeer vermoedelijke culturen (zie deel 9) en verricht een pathogeniteitstest (zie deel 10).

9. IDENTIFICATIE

Identificeer reinculturen van vermoedelijke *C. m.* ssp. *sepedonicus*-isolaten aan de hand van ten minste twee van de volgende, op verschillende biologische principes gebaseerde testen.

Voor zover van toepassing moet elke test ook worden uitgevoerd op bekende referentiestammen.

9.1. **Voedingstesten en enzymatische identificatietesten**

Bepaal de volgende fenotypische eigenschappen, die universeel aan-, respectievelijk afwezig zijn in *C. m.* ssp. *sepedonicus*, volgens de methoden van Lelliott en Stead (1987), Klement e.a. (1990), Schaad (2001), Anoniem (1987).

Alle media moeten bij 21 °C worden geïncubeerd en na zes dagen worden onderzocht. Indien geen groei is opgetreden, incuberen tot maximaal 20 dagen.

Alle testen moeten een controle met bekende *C. m.* ssp. *sepedonicus* omvatten. Voedingstest en fysiologische testen moeten worden uitgevoerd met inocula van nutriënt-agarsubculturen. Morfologische vergelijkingen moeten worden gemaakt aan de hand van nutriënt-dextroseagarculturen.

Test	*Verwacht resultaat*
oxidatie/fermentatietest (O/F)	inert of zwak oxidatief
oxidaseactiviteit	–
groei bij 37 °C	–

▼M1

Test	*Verwacht resultaat*
ureaseactiviteit	–
esculinehydrolyse	+
zetmeelhydrolyse	– of zwak
tolerantie tegen 7 % NaCl	–
indoolvorming	–
katalaseactiviteit	+
H_2S-vorming	–
citraatassimilatie	–
afbraak van gelatine	–
zuurvorming uit glycerol	–
zuurvorming uit lactose	– of zwak
zuurvorming uit ramnose	–
zuurvorming uit salicine	–
gramkleuring (aanhangsel 9)	+

9.2. **IF-test**

a) Bereid een suspensie van ongeveer 10^6 cellen/ml in IF-buffer (aanhangsel 3).

b) Bereid een tweevoudige verdunningsreeks van een geschikt antiserum.

c) Pas de IF-procedure toe (deel 4).

d) De IF-test is positief als de IF-titer van de kweek gelijkwaardig is aan die van de positieve controle.

9.3. **PCR-test**

a) Bereid een suspensie van ongeveer 10^6 cellen/ml in UPW.

b) Verwarm 100 µl van de celsuspensie in gesloten buisjes 4 minuten in een verwarmingsblok of kokendwaterbad op 100 °C. Zo nodig kan vers bereid NaOH toegevoegd worden tot een eindconcentratie van 0,05 M om de cellysis te bevorderen. Hierna kunnen de monsters bij –16 tot –24 °C worden opgeslagen tot zij nodig zijn.

c) Gebruik geschikte PCR-procedures voor de amplificatie van *C. m.* ssp. *sepedonicus* (bv. Pastrik, 2000, zie aanhangsel 4; Li en de Boer, 1995; Mills e.a., 1997; Pastrik en Rainey, 1999; Schaad e.a., 1999).

d) Er wordt een positieve identificatie van *C. m.* ssp. *sepedonicus* verkregen als de PCR-amplicons van dezelfde grootte zijn en dezelfde restrictiefragmentlengtepolymorfismen hebben als de positieve controlestam.

9.4. **FISH-test**

a) Bereid een suspensie van ongeveer 10^6 cellen/ml in UPW.

b) Pas de FISH-procedure toe (deel 5).

c) De FISH-test is positief als de kweek en de positieve controle dezelfde reacties vertonen.

9.5. **Vetzuurprofiel (FAP)**

a) Laat de kweek 72 uur bij 21 °C (±1 °C) groeien op trypticasesojaagar.

b) Pas een geschikte FAP-procedure toe (Janse, 1991; Stead, 1992).

c) De FAP-test is positief als het profiel van de vermoedelijke cultuur identiek is aan die van de positieve controle. De aanwezigheid van de karakteristieke vetzuren 15:1 ante-iso A, 15:0 iso, 15:0 ante-iso, 16:0 iso, 16:0 en 17:0 ante-iso is een sterke aanwijzing voor *C. m.* ssp. *sepedonicus*. Bij andere genera, zoals *Curtobacterium, Arthrobacter* en *Micrococcus*, komen ook enkele van deze zuren voor; 15:1 ante-iso is echter in deze bacteriën zeldzaam, maar komt wel in alle *Clavibacter*-soorten voor in een concentratie tussen 1 en 5 %. In *C. m.* ssp. *sepedonicus* ligt de waarde gewoonlijk rond de 5 %.

9.6. **BOX-PCR**

a) Bereid een suspensie van ongeveer 10^6 cellen/ml in UPW.

b) Voer de test uit volgens de procedure (Smith e.a., 2001).

▼**M1**

10. BEVESTIGINGSTEST

De pathogeniteitstest moet worden uitgevoerd voor de definitieve bevestiging van een diagnose van *C. m.* ssp. *sepedonicus* en voor de bepaling van de virulentie van culturen die als *C. m.* ssp. *sepedonicus* geïdentificeerd zijn.

10.1. Bereid een inoculum van ongeveer 10^6 cellen/ml uit drie dagen oude kweken van het te onderzoeken isolaat en een geschikte positieve controlestam van *C. m.* ssp. *sepedonicus*.

10.2. Inoculeer vijf à tien auberginestengels van jonge zaailingen in het 3-bladstadium (deel 7.3 of 7.4).

10.3. Incubeer bij 18-24 °C met voldoende licht, een hoge relatieve vochtigheid en adequate bewatering waarbij verzadiging met water en droogtestress worden voorkomen (deel 7.7). Met reinculturen moet binnen twee weken typische verwelking optreden; planten die daarna geen symptomen vertonen (zie deel 7.8), moeten maximaal drie weken worden geïncubeerd bij temperaturen die de groei van aubergines bevorderen, maar 25 °C niet overschrijden (aanhangsel 8). Indien er na drie weken geen symptomen zijn, kan de cultuur niet worden bevestigd als een pathogene vorm van *C. m.* ssp. *sepedonicus*.

10.4. Neem voor de isolatie een stuk stengel van symptomatische planten 2 cm boven het inoculatiepunt. Maak dit fijn en suspendeer het in een klein volume steriel gedestilleerd water of steriele 50 mM fosfaatbuffer (aanhangsel 3). Maak een isolaat uit de suspensie door uitplaten van verdunningen of uitstrijken op MTNA en YPGA (aanhangsel 5), incubeer gedurende drie tot vijf dagen bij 21-23 °C en bestudeer de vorming van karakteristieke kolonies van *C. m.* ssp. *sepedonicus*.

▼**M1**

Aanhangsel 1

Bij de optimalisering en validering van de protocollen ingeschakelde laboratoria

Laboratorium [1]	Plaats	Land
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Wenen en Linz	Oostenrijk
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	België
Plantedirektoratet	Lyngby	Denemarken
Central Science Laboratory	York	Engeland
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Schotland
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Frankrijk
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Frankrijk
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Duitsland
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Duitsland
State Laboratory	Dublin	Ierland
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Nederland
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Aas	Noorwegen
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lissabon	Portugal
Nacionalni institut za biologijo	Ljubljana	Slovenië
Centro de Diagnóstico de Aldearrubia	Salamanca	Spanje

[1] Voor contactpersonen zie de website: http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main.

▼M1

Aanhangsel 2

Bereiding van positieve en negatieve controles voor de screeningtesten (PCR/IF en FISH)

Maak een cultuur van 72 uur van een virulente stam van *C. m.* ssp. *sepedonicus* [NCPPB 4053 of PD 406] op MTNA-basismedium en suspendeer deze in 10 mM fosfaatbuffer om een celdichtheid van ongeveer 1-2 × 10^8 kve/ml te verkrijgen. Dit wordt meestal bereikt met een licht troebele suspensie met een optische dichtheid van 0,20 bij 600 nm.

Neem stukjes uit het naveleinde van 200 knollen van een partij aardappelen met blanke schil waarvan bekend is dat zij vrij zijn van *C. m.* ssp. *sepedonicus*.

Verwerk de stukjes op de gebruikelijk wijze en resuspendeer de pellet in 10 ml.

Doe in 10 steriele microvaatjes van 1,5 ml telkens 900 µl geresuspendeerde pellet.

Breng 100 µl van de suspensie van *C. m.* ssp. *sepedonicus* over in het eerste microvaatje. Meng door vortexen.

Doe in de volgende vijf microvaatjes telkens een decimale verdunning.

De zes microvaatjes met bacteriën worden als positieve controles gebruikt. De vier microvaatjes zonder bacteriën worden als negatieve controles gebruikt. Etiketteer de microvaatjes als zodanig.

Doe aliquots van 100 µl in steriele microvaatjes van 1,5 ml om van elk controlemonster negen duplicaten te maken. Bewaar deze tussen –16 en –24 °C tot gebruik.

De aanwezigheid en concentratie van *C. m.* ssp. *sepedonicus* in de controlemonsters moet eerst door middel van IF bevestigd worden.

Voor de PCR-test wordt bij elke reeks analysemonsters een DNA-extractie van de positieve en negatieve controlemonsters gedaan.

Voor de IF- en de FISH-test worden bij elke reeks analysemonsters bepalingen aan de positieve en negatieve controlemonsters gedaan.

Bij de IF-, FISH- en PCR-tests moet *C. m.* ssp. *sepedonicus* ten minste worden gedetecteerd in de positieve controles met 10^6 en 10^4 cellen/ml en mag hij in geen van de negatieve controles worden gedetecteerd.

▼M1

Aanhangsel 3

Buffers voor testprocedures

ALGEMEEN: Ongeopende gesteriliseerde buffers kunnen maximaal een jaar bewaard worden.

1. **Buffers voor de extractieprocedure**

1.1. *Extractiebuffer (50 mM fosfaatbuffer, pH 7,0)*

Deze buffer wordt gebruikt voor de extractie van de bacterie uit plantenweefsel door homogenisatie of schudden.

NaH_2PO_4 (watervrij)	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
Gedestilleerd water	1,00 l

Los de ingrediënten op, controleer de pH en steriliseer 15 minuten in de autoclaaf bij 121 °C.

De volgende extra bestanddelen kunnen van pas komen:

	Doel	Hoeveelheid (per l)
Lubrol-vlokken	Ontvlokkingsmiddel (*)	0,5 g
DC siliconen-antischuim	Antischuimmiddel (*)	1,0 ml
Tetranatriumpyrofosfaat	Antioxidant	1,0 g
Polyvinylpyrrolidon-40 000 (PVP-40)	Binding van PCR-remmers	50 g

(*) Voor gebruik bij de homogenisatie-extractiemethode.

1.2. *Pelletbuffer (10 mM fosfaatbuffer, pH 7,2)*

Deze buffer word gebruikt om de extracten van de stukjes naveleinde te resuspenderen en te verdunnen nadat ze door centrifugeren in een pellet geconcentreerd zijn.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
Gedestilleerd water	1,00 l

Los de ingrediënten op, controleer de pH en steriliseer 15 minuten in de autoclaaf bij 121 °C.

2. **Buffers voor de IF-test**

2.1. *IF-buffer (10 mM fosfaatgebufferde fysiologische zoutoplossing (PBS), pH 7,2*

Deze buffer wordt gebruikt voor het verdunnen van antilichamen.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Gedestilleerd water	1,0 l

Los de ingrediënten op, controleer de pH en steriliseer 15 minuten in de autoclaaf bij 121 °C.

2.2. *IF-buffer-Tween*

Deze buffer wordt gebruikt voor het wassen van de objectglaasjes.

Voeg 0,1 % Tween 20 aan de IF-buffer toe.

2.3. *Fosfaatgebufferde glycerol, pH 7,6*

Deze buffer wordt gebruikt als inbedvloeistof op de vensters van de IF-glaasjes om de fluorescentie te versterken.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	3,2 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,15 g
Glycerol	50 ml
Gedestilleerd water	100 ml

▼**M1**

Antifading inbedmiddelen zijn in de handel verkrijgbaar, bv. Vectashield® (Vector Laboratories) of Citifluor® (Leica).

▼**M1**

Aanhangsel 4

Bepaling van het besmettingsniveau met de IF- en de FISH-test

1. Tel het aantal typische fluorescerende cellen per veld (c).
2. Bereken het aantal typische fluorescerende cellen per venstertje van het objectglaasje (C).

   $C = c \times S/s$

   waarbij S = oppervlakte van een venstertje van het objectglaasje, en

   s = oppervlakte van het objectiefveld

   $s = \pi i^2/4G^2K^2$ waarbij i = veldcoëfficiënt (tussen 8 en 24, afhankelijk van het type oculair),

   K = buiscoëfficiënt (1 of 1,25),

   G = vergrotingsfactor (100x, 40x enz.) van het objectief.

3. Bereken het aantal typische fluorescerende cellen per ml geresuspendeerde pellet (N)

   $N = C \times 1\,000/y \times F$

   waarbij y = volume van de geresuspendeerde pellet op het venster, en

   F = verdunningsfactor van de geresuspendeerde pellet.

▼**M1**

Aanhangsel 5

Isolatie- en kweekmedia voor *C. m.* **ssp.** *sepedonicus*

a) *Algemene kweekmedia*

Nutriënt-agar (NA)

Nutrient Agar (Difco)	23,0 g
Gedestilleerd water	1,0 l

Los de ingrediënten op en steriliseer 15 minuten in de autoclaaf bij 121 °C.

Nutriënt-dextroseagar (NDA)

Difco Bacto Nutrient Agar met 1 % d(+)-glucose (monohydraat). Steriliseer 20 minuten in de autoclaaf bij 115 °C.

Gist-pepton-glucoseagar (YPGA)

Gistextract (Difco)	5,0 g
Bacto-Peptone (Difco)	5,0 g
d(+)-glucose (monohydraat)	10,0 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Gedestilleerd water	1,0 l

Los de ingrediënten op en steriliseer 15 minuten in de autoclaaf bij 121 °C.

Gistextract-minerale-zoutenmedium (YGM)

Bacto-Yeast-Extract (Difco)	2,0 g
d(+)-glucose (monohydraat)	2,5 g
K_2HPO_4	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,1 g
$MnSO_4.\ H_2O$	0,015 g
NaCl	0,05 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,005 g
Bacto-Agar (Difco)	18 g
Gedestilleerd water	1,0 l

Los de ingrediënten op en steriliseer telkens een halve liter medium 20 minuten in de autoclaaf bij 115 °C.

b) *Gevalideerde selectieve kweekmedia*

MTNA-medium

Tenzij anders vermeld zijn alle bestanddelen afkomstig van BDH.

Gistextract (Difco)	2,0 g
Mannitol	2,5 g
K_2HPO_4	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
NaCl	0,05 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,1 g
$MnSO_4.\ H_2O$	0,015 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,005 g
Agar (Oxoid no. 1)	16,0 g
Gedestilleerd water	1,0 l

Los de ingrediënten op en breng de pH op 7,2. Autoclaveer 15 minuten bij 121 °C, koel af tot 50 °C en voeg de volgende antibiotica toe: trimethoprim 0,06 g, nalidixinezuur 0,002 g, amfotericine B 0,01 g.

▼**M1**

Voorraadoplossingen antibiotica: trimethoprim (Sigma) en nalidixinezuur (Sigma) (beide 5 mg/ml) in methanol 96 %, amfotericine B (Sigma) (1 mg/ml) in dimethylsulfoxide. De voorraadoplossingen worden gefiltersteriliseerd.

NB:

Het basismedium is drie maanden houdbaar. Na toevoeging van antibiotica is het één maand houdbaar indien koel bewaard.

NCP-88 medium

Nutrient Agar (Difco)	23 g
Gistextract (Difco)	2 g
D-mannitol	5 g
K_2HPO_4	2 g
KH_2PO_4	0,5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,25 g
Gedestilleerd water	1,0 l

Los de ingrediënten op en breng de pH op 7,2. Autoclaveer, koel af tot 50 °C en voeg de volgende antibiotica toe: polymyxine B-sulfaat (Sigma) 0,003 g, nalidixinezuur (Sigma) 0,008 g, cycloheximide (Sigma) 0,2 g.

Maak de volgende voorraadoplossingen van de antibiotica: nalidixinezuur in 0,01 M NaOH, cycloheximide in ethanol 50 %, polymyxine B-sulfaat in gedestilleerd water. De voorraadoplossingen worden gefiltersteriliseerd.

NB:

Het basismedium is drie maanden houdbaar. Na toevoeging van antibiotica is het één maand houdbaar indien koel bewaard.

▼**M1**

Aanhangsel 6

Gevalideerd PCR-protocol en bijbehorende reagentia

NB:

Bij de voorbereidende testen moeten op zijn minst 10^3-10^4 cellen van *C. m.* ssp. *sepedonicus* per ml monsterextract reproduceerbaar gedetecteerd kunnen worden.

De voorbereidende testen mogen verder geen fout-positieve uitslagen vertonen bij een selectie van bacteriestammen.

1. **Multiplex-PCR-protocol met interne PCR-controle (Pastrik, 2000)**

1.1. *Oligonucleotide-primers*

Forward primer PSA-1 5'- ctc ctt gtg ggg tgg gaa aa -3'

Reverse primer PSA -R 5'- tac tga gat gtt tca ctt ccc c -3'

Forward primer NS-7-F 5'- gag gca ata aca ggt ctg tga tgc -3'

Reverse Primer NS-8-R 5'- tcc gca ggt tca cct acg ga -3'

Verwachte amplicongrootte van *C. m.* ssp. *sepedonicus* template-DNA = 502 bp (PSA-primerset).

Verwachte amplicongrootte van de 18S rRNA interne PCR-controle = 377 bp (NS-primerset).

1.2. *PCR-reactiemix*

Reagens	Hoeveelheid per reactie	Eindconcentratie
Steriel UPW	15,725 µl	
10x PCR-buffer [1] (15 mM $MgCl_2$)	2,5 µl	1x (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (fraction V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-nTP mix (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer PSA-1 (10µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer PSA-R (10µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer NS-7-F (10µM) [2]	0,1 µl	0,04 µM
Primer NS-8-R (10µM) [2]	0,1 µl	0,04 µM
Taq polymerase (5U/µl) [1]	0,2 µl	1,0 U
Monstervolume	5,0 µl	
Totaalvolume	25,0 µl	

[1] De methoden zijn gevalideerd met *Taq* polymerase van Perkin Elmer (AmpliTaq of Gold) en Gibco BRL.

[2] De concentratie van de primers NS-7 F en NS-8-R is geoptimaliseerd voor de extractie van stukjes naveleinde van aardappel met behulp van de homogenisatiemethode en DNA-zuivering volgens Pastrik (2000) (zie deel 6.1.a) en deel 6.2). Als de extractie wordt uitgevoerd door schudden of andere DNA-isolatiemethoden moeten de reagensconcentraties opnieuw geoptimaliseerd worden.

1.3. *PCR-reactiecondities*

Werk het volgende programma af:

1 cyclus van:	i)	3 minuten bij 95 °C (denaturatie van het template-DNA)
10 cycli van:	ii)	1 minuut bij 95 °C (denaturatie van het template-DNA)
	iii)	1 minuut bij 64 °C (annealing van de primers)
	iv)	1 minuut bij 72 °C (extensie van de kopie)
25 cycli van:	v)	30 seconden bij 95 °C (denaturatie van het template-DNA)
	vi)	30 seconden bij 62 °C (annealing van de primers)
	vii)	1 minuut bij 72 °C (extensie van de kopie)
1 cyclus van:	viii)	5 minuten bij 72 °C (laatste extensie)

▼**M1**

ix) koeling op 4 °C.

NB:

Dit programma is geoptimaliseerd voor een MJ Research PTC 200 thermal cycler. Bij gebruik van andere modellen moet de duur van de cycli ii), iii), iv), v), vi) en vii) wellicht gewijzigd worden.

1.4. *Restrictie-enzymanalyse van de amplicons*

PCR-amplicons van DNA van *C. m.* ssp. *sepedonicus* produceren met enzym *Bgl* II na 30 minuten incuberen bij 37 °C een karakteristiek restrictiefragmentlengtepolymorfisme. De uit *C. m.* ssp. *sepedonicus*-specifiek fragment verkregen restrictiefragmenten zijn 282 en 220 bp lang.

2. **Bereiding van de laadbuffer**

2.1. *Broomfenolblauw (10 %-voorraadoplossing)*

Broomfenolblauw	5 g
Gedestilleerd water (bidest)	50 ml

2.2. *Laadbuffer*

Glycerol (86 %)	3,5 ml
Broomfenolblauw (5.1)	300 µl
Gedestilleerd water (bidest)	6,2 ml

3. **10x TAE-buffer (Tris-Acetaat-EDTA), pH 8,0**

Tris-buffer	48,4 g
IJsazijn	11,42 ml
EDTA (dinatriumzout)	3,72 g
Gedestilleerd water	1,00 l

Verdun tot 1x voor gebruik.

De buffer is ook in de handel verkrijgbaar (bv. Invitrogen of gelijkwaardig).

▼M1

Aanhangsel 7

Gevalideerde reagentia voor de FISH-test

1. **Oligo-probes**

Cms-specifieke probe CMS-CY3-01:	5'- ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg -3'
Niet-specifieke eubacteriële probe EUB-338-FITC:	5'- gct gcc tcc cgt agg agt-3'

2. **Fixatief**

(LET OP! HET FIXATIEF BEVAT HET GIFTIGE PARAFORMALDEHYDE. DRAAG HANDSCHOENEN EN ADEM DE DAMPEN NIET IN. AANGERADEN WORDT OM IN EEN ZUURKAST TE WERKEN.)

i) Verwarm 9 ml water van moleculair-biologische kwaliteit (bv. ultrazuiver water, UPW) tot ongeveer 60 °C en voeg 0,4 g paraformaldehyde toe. Het paraformaldehyde lost op na toevoeging van 5 druppels NaOH 1 N en roeren met een magneetroerder.

ii) Breng de pH op 7,0 door toevoegen van 1 ml fosfaatbuffer 0,1 M (PB, pH 7,0) en 5 druppels HCl 1 N. Controleer de pH met indicatorpapier en corrigeer zo nodig met HCl of NaOH.

(LET OP! GEBRUIK GEEN PH-METER IN OPLOSSINGEN DIE PARAFORMALDHYDE BEVATTEN.)

iii) Filtreer de oplossing over een 0,22 µm membraanfilter en bewaar stofvrij bij 4 °C tot gebruik.

iv) *Opmerking:*

Een alternatief fixatief is ethanol 96 %.

3. **3x Hybmix**

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (gefiltersteriliseerd en geautoclaveerd)	15 mM

Verdun tot 1x voor gebruik.

4. **Hybridisatieoplossing**

1x Hybmix

Natriumdodecylsulfaat (SDS)	0,01 %
probe EUB 338	5 ng/µl
probe CMSCY301	5 ng/µl

Bereid hoeveelheden hybridisatieoplossing zoals in tabel 1 aangegeven. Voor elk objectglaasje (dat twee verschillende monsters in duplo bevat) is 90 µl hybridisatieoplossing nodig.

Tabel 1 Hoeveelheden te bereiden hybridisatieoplossing

Aantal glaasjes:	2 glaasjes	8 glaasjes
Steriel UPW	50,1	200,4
3x hybmix	30,0	120,0
1 % SDS	0,9	3,6
Probe EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Probe CMSCY301 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Total volume (µl)	90,0	360,0

NB: Alle oplossingen die lichtgevoelige oligo-probes bevatten, moeten bij –20 °C in het donker bewaard worden en tijdens het gebruik tegen direct zonlicht en kunstlicht worden beschermd.

5. **0,1 M fosfaatbuffer, pH 7,0**

Na_2HPO_4	8,52 g

▼**M1**

KH_2PO_4	5,44 g
Gedestilleerd water	1,00 l

Los de ingrediënten op, controleer de pH en steriliseer 15 minuten in de autoclaaf bij 121 °C.

▼**M1**

Aanhangsel 8

Kweken van aubergines

Zaaizaad van aubergineplanten (*Solanum melongena*) in gepasteuriseerde zaaigrond. Zaailingen met volledig ontwikkelde zaadlobben (10-14 dagen) worden overgepoot in gepasteuriseerde potgrond.

Aubergineplanten moeten worden gekweekt in een kas met de volgende omgevingsomstandigheden:

daglengte:		14 uur of natuurlijke daglengte indien groter;
temperatuur:	overdag	21-24 °C,
	's nachts	15 °C.

Vatbare auberginerassen: „Black Beauty”,
„Long Tom”,
„Rima”,
„Balsas”.

Leverancier: zie de website: http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main.

▼M1

Aanhangsel 9

Gramkleuring (gewijzigd volgens Hucker) (Doetsch, 1981) ([1])

Kristalvioletoplossing

Los 2 g kristalviolet op in 20 ml ethanol 95 %.

Los 0,8 g ammoniumoxalaat op in 80 ml gedestilleerd water.

Meng de twee oplossingen.

Lugol-oplossing

Jood	1 g
Kaliumjodide	2 g
Gedestilleerd water	300 ml

Vermaal de vaste stoffen samen met stamper en mortier. Voeg ze aan het water toe, sluit het vat en schud om op te lossen.

Safranine-tegenkleuringsoplossing

Voorraadoplossing:

Safranine O	2,5 g
Ethanol 95 %	100 ml

Meng en bewaar deze oplossing.

Verdun 1:10 om een werkoplossing te verkrijgen.

Kleuringsprocedure

1. Bereid de preparaten voor, droog ze aan de lucht en fixeer ze thermisch.
2. Bedek het objectglaasje 1 minuut met kristalvioletoplossing.
3. Spoel kort met kraanwater.
4. Bedek 1 minuut met lugol-oplossing.
5. Spoel met kraanwater en dep droog met filtreerpapier.
6. Ontkleur met druppelsgewijs toegevoegde ethanol 95 % tot de ontkleuring stopt, of houd onder zacht schudden 30 seconden ondergedompeld.
7. Spoel met kraanwater en dep droog met filtreerpapier.
8. Bedek 10 seconden met safranineoplossing.
9. Spoel met kraanwater en dep droog met filtreerpapier.

Grampositieve bacteriën kleuren violetblauw, gramnegatieve bacteriën rozerood.

LITERATUURVERWIJZINGEN

1. Anoniem, 1987. Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. Commissie van de Europese Gemeenschappen, Luxemburg. Publ. EUR 11 288 EN, 21 blz.
2. Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. *Rev. Pl. Path*. 49:213-218.
3. Dinesen, I.G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. *EPPO Bull*. 14 (2):147-152.
4. Doetsch, R.N. 1981. Determinative methods of light microscopy. In: *Manual of methods for general bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, 21-23.
5. Hugh, R. en F. Leifson. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. *J. Bact*. 66: 24-26.
6. Janse, J. D. 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty-acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 14: 335-345.

([1]) Er kunnen ook in de handel verkrijgbare oplossingen en kleuringskits worden gebruikt.

▼**M1**

7. Janse, J.D. en J. Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. *EPPO Bull*. No 17(1987):1-10.

8. Jansing, H. en K. Rudolph. 1998. Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* and development of a semi-selective medium. *Journal of Plant Diseases and Protection* 105:590-601.

9. Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, Londen, 178:703.

10. Klement Z., K. Rudolph en D.C. Sands. 1990. *Methods in Phytobacteriology.* Akadémiai Kiadó, Boedapest, 568 blz.

11. Lelliott, R.A. 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. *J. Appl. Bact*. 29:114-118.

12. Lelliott, R.A., E. Billing en A.C. Hayward. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. Appl. Bact*. 29:470-489.

13. Lelliott, R. A. en P.W. Sellar. 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Kotth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks. *EPPO Bull*. 6(2): 101-106.

14. Li, X. en S.H. de Boer. 1995. Selection of Polymerase Chain Reaction primers from RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus. Phytopathology* 85:837-842.

15. Mills, D., B.W. Russell en J.W. Hanus. 1997. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization. *Phytopathology* 87(8):853-861.

16. Pastrik, K.-H. en R.A. Rainey. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. *J. Phytopathology* 147:687-693.

17. Pastrik, K.-H. 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. European Journal of Plant Pathology 106:155-165.

18. Ramamurthi, C.S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria. *Mem. Cornell Agric. Exp. Sta*. 366, 52 blz.

19. Schaad, W., Y. Berthier-Schaad, A. Sechler en D. Knorr. (1999) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. *Plant Disease* 83:1095-1100.

20. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [uitg.]. – 3e druk. St. Paul, Minnesota, 373 blz.

21. Skerman, V.B.D. 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2e druk, William and Wilkins Company, Baltimore.

22. Smith, N.C., J. Hennesy en D.E. Stead. 2001. Repetetive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1 *Ralstonia solanacearum* primer for rapid identification of plant pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus. European Journal of Plant Pathology* 107(7):739-748.

23. Sneath, P.H.A. en V.G. Collins. 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of Pseudomonas working party. *Antonie van Leeuwenhoek*, 40:481-527.

24. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42: 281-295.

25. Wullings, B.A., A.R. van Beuningen, J.D. Janse en A.D.L. Akkermans. 1998. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent *in situ* hybridization with 23s rRNA-targeted probes. *Appl. Environ. Microbiol*. 64:4546-4554.

▼**M1**

BIJLAGE II

1. Voor elke vermoede aanwezigheid van het organisme waarvoor de screeningtest(en) volgens de in bijlage I beschreven methoden een positieve uitslag heeft (hebben) opgeleverd en waarvoor de bevestiging of de weerlegging na de volledige uitvoering van genoemde methoden nog wordt afgewacht, moeten:

   — alle bemonsterde knollen en voor zover mogelijk alle bemonsterde planten,

   — het resterende extract en de daarbij gemaakte preparaten voor de screeningtest(en), bijvoorbeeld de immunofluorescentiepreparaten,

   en

   — alle relevante documentatie

   bewaard en waar van toepassing adequaat geconserveerd worden totdat het onderzoek volgens genoemde methoden is afgerond.

   Met de bewaarde knollen kunnen zo nodig rassenproeven worden uitgevoerd.

2. Ingeval de aanwezigheid van het organisme wordt bevestigd, moeten:

   — het in punt 1 genoemde materiaal,

   en

   — een monster van het met het knol- of plantenextract besmette aubergine-materiaal,

   en

   — de geïsoleerde cultuur van het organisme

   gedurende ten minste één maand na de kennisgeving krachtens artikel 5, lid 2, bewaard en adequaat geconserveerd worden.

▼**M1**

BIJLAGE III

1. Voor het bepalen van de omvang van de waarschijnlijke besmetting als bedoeld in artikel 5, lid 1, onder b), moet rekening worden gehouden met de volgende elementen:

   — knollen of planten die zijn geteeld op de krachtens artikel 5, lid 1, onder a), besmet verklaarde plaats van productie;

   — productieplaatsen met contact in productiewijze met krachtens artikel 5, lid 1, onder a), besmet verklaarde knollen of planten, met inbegrip van die bedrijven waar gereedschap of faciliteiten rechtstreeks of via een gemeenschappelijke contractpartner gezamenlijk wordt of worden gebruikt;

   — knollen of planten die op de in het tweede streepje bedoelde productieplaatsen zijn geproduceerd of op dergelijke productieplaatsen aanwezig waren in de periode waarin de krachtens artikel 5, lid 1, onder a), besmet verklaarde knollen of planten op de in het eerste streepje bedoelde productieplaats aanwezig waren;

   — plaatsen waar aardappelen afkomstig van de in de voorgaande streepjes bedoelde productieplaatsen worden gehanteerd;

   — machines, voertuigen, vaartuigen, opslagplaatsen, of delen daarvan, en alle andere voorwerpen, verpakkingsmateriaal inbegrepen, die met de overeenkomstig artikel 5, lid 1, onder a), besmet verklaarde knollen of planten in contact kunnen zijn geweest;

   — knollen of planten die zijn opgeslagen in of in contact zijn geweest met de in het voorgaande streepje genoemde gebouwen of voorwerpen voordat deze waren gereinigd en ontsmet;

   — op grond van de uitslagen van de in artikel 6 bedoelde testen, knollen of planten met een klonale verwantschap via zuster- of uitgangsmateriaal met als krachtens artikel 5, lid 1, onder a), besmet verklaarde knollen of planten en waarvoor besmetting via een klonaal verband waarschijnlijk lijkt ondanks een negatieve testuitslag. Er kunnen rassenproeven worden uitgevoerd om het ras van de besmette en klonaal verwante knollen of planten na te gaan,

     en

   — de plaatsen waar de in het zevende streepje bedoelde knollen en planten worden geteeld.

2. Bij het bepalen van de mogelijke verspreiding als bedoeld in artikel 5, lid 1, onder c), wordt rekening gehouden met:

   — de nabijheid van andere productieplaatsen van aardappelen of andere waardplanten;

   — de gemeenschappelijke productie en het gemeenschappelijk gebruik van voorraden pootaardappelen;

3. De in artikel 5, lid 2, eerste alinea, bedoelde kennisgeving vindt als volgt plaats:

   — onmiddellijk nadat de aanwezigheid van het organisme door laboratoriumtesten met de in bijlage I beschreven methoden is bevestigd, worden ten minste meegedeeld:

     — de rasnaam van de partij aardappelen;

     — het soort aardappelen (poot-, consumptie-, enz.) en voor pootaardappelen de categorie;

   — de lidstaat waar de aanwezigheid is bevestigd stelt de lidstaten waaruit of waarnaar de besmetting van aardappelen zich kan verspreiden of kan hebben verspreid onmiddellijk in kennis van de informatie die nodig is om aan artikel 5, lid 3, te voldoen, zoals:

     — de rasnaam van de partij aardappelen;

     — naam en adres van de verzender en de ontvanger;

     — de datum van aflevering van de partij aardappelen;

     — de omvang van de afgeleverde partij aardappelen;

     — een kopie van het plantenpaspoort of ten minste het nummer daarvan indien van toepassing, het registratienummer van de teler of handelaar indien van toepassing en een kopie van de afleveringsbon.

   De Commissie wordt er onmiddellijk van in kennis gesteld wanneer deze informatie is verstrekt;

   — nadat alle onderzoeken zijn afgerond, voor elk geval:

     — de datum waarop de besmetting is bevestigd;

▼**M1**

— een korte beschrijving van het onderzoek dat is verricht om de bron en de mogelijke verspreiding van de besmetting te achterhalen, met vermelding van de gerealiseerde bemonsteringsintensiteit;

— informatie over de geïdentificeerde of vermoede besmettingsbronnen;

— informatie over de reikwijdte van de besmetverklaring, waaronder het aantal besmette productieplaatsen en het aantal partijen, onder vermelding van het ras en voor pootaardappelen de categorie;

— gegevens over de zoneafbakening, met het aantal productieplaatsen in de zone die niet besmet verklaard zijn;

— alle andere door de Commissie verlangde informatie over de geconstateerde besmetting(en).

▼**M1**

BIJLAGE IV

1. Onder de in artikel 7, lid 1, bedoelde opruiming onder officieel toezicht wordt verstaan:

— gebruik als diervoeder na een warmtebehandeling die het risico dat het organisme overleeft, uitsluit,

of

— storting op een officieel erkende, speciale stortplaats waar er geen aanwijsbaar risico is dat het organisme in het milieu terechtkomt door bv. lekkage naar landbouwgrond,

of

— verbranding,

of

— rechtstreekse en onverwijlde levering, voor industriële verwerking, aan verwerkende bedrijven die over officieel erkende, adequate afvalverwijderingsinstallaties beschikken waarvoor is vastgesteld dat er geen aanwijsbaar risico op verspreiding van het organisme bestaat, en die over een systeem beschikken om ten minste de uitgaande voertuigen te reinigen en te ontsmetten,

of

— andere maatregelen, op voorwaarde dat is vastgesteld dat er geen aanwijsbaar risico bestaat dat het organisme zich kan verspreiden; van deze maatregelen moet onder opgave van de redenen ervoor aan de Commissie en de andere lidstaten kennis worden gegeven.

Afvalstoffen die overblijven na of voortkomen uit de bovengenoemde behandelingen, worden door middel van officieel erkende methoden verwijderd overeenkomstig bijlage V.

2. Het in artikel 7, lid 2, bedoelde geëigende gebruik, respectievelijk de daar bedoelde adequate opruiming van knollen of planten waarvan overeenkomstig artikel 5, lid 1, onder b), is vastgesteld dat zij waarschijnlijk besmet zijn, onder toezicht van de verantwoordelijke officiële instanties van de betrokken lidstaten, waarbij moet worden gezorgd voor een adequate communicatie tussen de betrokken verantwoordelijke officiële instanties om te garanderen dat dergelijk toezicht te allen tijde plaatsvindt, alsmede voor erkenning, door de verantwoordelijke officiële instanties van de lidstaat waar de aardappelen verpakt of verwerkt moeten worden, van de in het eerste en tweede streepje bedoelde afvalverwijderingsinstallaties, omvat:

— het gebruik als consumptieaardappelen, verpakt voor rechtstreekse aflevering en voor gebruik zonder verdere ompakking, op een locatie met adequate afvalverwijderingsinstallaties. Werken met pootaardappelen op deze locatie is uitsluitend toegestaan als dat gescheiden of na reiniging en ontsmetting gebeurt,

of

— het gebruik als aardappelen bestemd voor industriële verwerking, en bestemd voor rechtstreekse en onverwijlde aflevering aan een verwerkend bedrijf met adequate afvalverwijderingsinstallaties en een systeem voor reiniging en ontsmetting van ten minste de uitgaande voertuigen,

of

— enige andere vorm van gebruik of verwijdering, op voorwaarde dat vaststaat dat er geen aanwijsbaar risico bestaat dat het organisme zich kan verspreiden, onder voorbehoud van goedkeuring door de genoemde verantwoordelijke officiële instanties.

3. Als adequate methoden voor het reinigen en ontsmetten van de in artikel 7, lid 3, bedoelde voorwerpen gelden die waarvan is vastgesteld dat er geen aanwijsbaar risico op verspreiding van het organisme bestaat, en die onder toezicht van de verantwoordelijke officiële instanties van de lidstaten worden toegepast.

4. Onder de in artikel 7, lid 4, bedoelde maatregelen die door de lidstaten in de krachtens artikel 5, lid 1, onder c), afgebakende zones moeten worden uitgevoerd, zijn begrepen:

4.1. op krachtens artikel 5, lid 1, onder a), besmet verklaarde productieplaatsen:

a) op een krachtens artikel 5, lid 1, onder a), besmet verklaard veld:

i) — gedurende ten minste de drie teeltjaren volgende op het jaar waarin de besmetverklaring gedaan is:

▼M1

— maatregelen om opslag van aardappelplanten en andere natuurlijke waardplanten van het organisme te elimineren,

en

— een verbod om aardappelknollen, aardappelplanten of aardappelzaad, of andere natuurlijke waardplanten van het organisme, of gewassen waarvoor een aanwijsbaar risico bestaat dat het organisme zich van daaruit kan verspreiden, aan te planten;

— in de eerste teeltperiode voor aardappelen volgende op de in het derde streepje bedoelde periode, en op voorwaarde dat het veld gedurende ten minste de twee aan de opplant voorafgaande teeltjaren bij officiële inspecties vrij is bevonden van opslag van aardappelplanten en andere natuurlijke waardplanten van het organisme, uitsluitend productie van consumptieaardappelen waarbij de geoogste knollen volgens de in bijlage I beschreven procedure worden getest;

— in de teeltperiode die volgt op de in het vorige streepje bedoelde teeltperiode en volgens een passende wisselcyclus, die ten minste twee jaar dient te zijn als het gaat om pootaardappelen, opplant van aardappelen voor de productie van pootaardappelen of consumptieaardappelen, vergezeld van een officieel onderzoek als bedoeld in artikel 2, lid 1, of

ii) — gedurende vier teeltjaren volgende op dat van de besmetverklaring:

— maatregelen om opslag van aardappelplanten en andere natuurlijke waardplanten van het organisme te elimineren,

en

— volledige braaklegging van het veld of bestemming van het veld tot blijvend grasland dat frequent kort wordt gemaaid of intensief wordt begraasd;

— in de eerste teeltperiode voor aardappelen volgende op de in het vorige streepje bedoelde periode, en op voorwaarde dat het veld gedurende ten minste de twee aan de opplant voorafgaande teeltjaren bij officiële inspecties vrij is bevonden van opslag van aardappelplanten en andere natuurlijke waardplanten van het organisme, productie van poot- of consumptieaardappelen waarbij de geoogste knollen volgens de in bijlage I beschreven procedure worden getest;

b) op alle andere velden van de besmette productieplaats, mits ten overstaan van de verantwoordelijke officiële instanties is aangetoond dat de risico's van opslag van aardappelplanten en andere natuurlijke waardplanten van het organisme geëlimineerd zijn:

— in de teeltperiode volgende op de besmetverklaring een verbod om aardappelknollen, aardappelplanten, aardappelzaad, of andere natuurlijke waardplanten van het organisme aan te planten, of

— poten van gecertificeerd pootgoed voor de teelt van uitsluitend consumptieaardappelen;

— in de tweede teeltperiode na de besmetverklaring, poten van uitsluitend gecertificeerd pootgoed of pootgoed dat bij officiële testen vrij van ringrot is gebleken en onder officieel toezicht geteeld is op andere productieplaatsen dan de onder 4.1 bedoelde, voor de teelt van poot- of consumptieaardappelen;

— in ten minste de derde teeltperiode na de besmetverklaring: poten van uitsluitend gecertificeerd pootgoed of pootgoed dat onder officieel toezicht uit gecertificeerd pootgoed is voortgebracht, voor de teelt van poot- of consumptieaardappelen;

— in elk van de in bovenstaande streepjes bedoelde teeltjaren worden maatregelen genomen om opslag van aardappelplanten en van natuurlijke waardplanten van het organisme, indien aanwezig, te elimineren en worden voor elk aardappelveld de geoogste aardappelen getest volgens de in bijlage I beschreven procedure;

c) onmiddellijk na de besmetverklaring krachtens artikel 5, lid 1, onder a), en na het eerste daaropvolgende teeltjaar, reiniging en ontsmetting volgens adequate methoden als aangegeven in punt 3, van alle machines en opslaginrichtingen op de plaats van productie die voor aardappelen zijn gebruikt;

d) in eenheden voor beschermde teelt waarin het teeltmedium volledig kan worden vervangen:

▼**M1**

— een verbod om knollen, planten of aardappelzaad aan te planten tenzij de productie-eenheid aan onder officieel toezicht genomen maatregelen is onderworpen om het organisme te vernietigen en alle waardmateriaal te verwijderen, waarbij op zijn minst het teeltmedium volledig wordt vervangen en de productie-eenheid en alle gereedschappen en machines worden gereinigd en ontsmet, en de verantwoordelijke officiële instanties hierna toestemming hebben verleend om opnieuw aardappelen te produceren,

en

— gebruik bij de aardappelproductie van gecertificeerde pootaardappelen, of miniknollen of microplanten van geteste bronnen;

4.2. in de afgebakende zones moeten de lidstaten, onverminderd de in punt 4.1 genoemde maatregelen:

a) ervoor zorgen dat machines en opslaginrichtingen op dergelijke bedrijven die bij de aardappelteelt zijn gebruikt, onmiddellijk na de besmetverklaring worden gereinigd en zo nodig ontsmet volgens de in punt 3 van deze bijlage aangegeven adequate methoden;

b) onmiddellijk, en gedurende ten minste drie teeltperioden na de besmetverklaring:

— ervoor zorgen dat hun verantwoordelijke officiële instanties toezicht houden op bedrijfsterreinen of -gebouwen waar aardappelknollen worden geteeld, opgeslagen of gehanteerd en op bedrijven waar contractueel aardappelmachines worden gebruikt;

— bepalen dat in die zone uitsluitend gecertificeerd pootgoed of onder officieel toezicht geteeld pootgoed voor de aardappelteelt mag worden gebruikt, en dat pootgoed dat geteeld is op productieplaatsen die overeenkomstig artikel 5, lid 1, onder b), „waarschijnlijk besmet” zijn verklaard, na de oogst onderzocht wordt;

— bepalen dat op alle bedrijfsinrichtingen in de zone de voorraden geoogste pootaardappelen gescheiden worden gehouden van die van consumptieaardappelen, of tussen de opslag van pootaardappelen en van consumptieaardappelen een systeem van reiniging en ontsmetting wordt toegepast;

— een officieel onderzoek verrichten als omschreven in artikel 2, lid 1;

c) indien relevant, een programma opstellen om de pootaardappelvoorraden binnen een passende termijn volledig te vervangen.

▼**M1**

BIJLAGE V

De officieel erkende afvalverwijderingsmethoden, bedoeld in bijlage IV, punt 1, moeten aan de volgende eisen voldoen om ieder aanwijsbaar risico dat het organisme zich kan verspreiden, weg te nemen:

i) afval van aardappelen (waaronder uitschot van aardappelen en schillen) en al het andere vaste afval dat met aardappelen in contact is geweest (waaronder grond, stenen en ander materiaal), moet:

— worden gestort op een officieel erkende, speciale stortplaats waar er geen aanwijsbaar risico is dat het organisme in het milieu terechtkomt door bv. lekkage naar landbouwgrond. Het afval wordt rechtstreeks naar de stortplaats vervoerd, op zodanige wijze dat geen afval kan worden verloren,

of

— worden verbrand,

of

— op andere wijze worden verwijderd, op voorwaarde dat is vastgesteld dat er geen aanwijsbaar risico bestaat dat het organisme zich verspreidt; van de genomen maatregelen moet aan de Commissie en de andere lidstaten kennis worden gegeven.

ii) vloeibaar afval: vloeibaar afval dat gesuspendeerde vaste stoffen bevat moet, voordat het wordt verwijderd, worden gefiltreerd of een proces ondergaan waarbij dergelijke stoffen worden neergeslagen en verwijderd. De verkregen vaste stoffen moeten worden verwijderd als aangegeven onder i).

Het vloeibare afval wordt vervolgens:

— gedurende ten minste 30 minuten verhit tot minimaal 60 °C voordat het wordt afgevoerd,

of

— op een andere officieel goedgekeurde wijze onder officieel toezicht verwijderd zodat er geen aanwijsbaar risico bestaat dat het afval in contact komt met landbouwgrond. Nadere bijzonderheden over die maatregelen worden aan de andere lidstaten en de Commissie meegedeeld.

De in deze bijlage beschreven methoden gelden ook voor het afval dat ontstaat bij de hantering, verwijdering en verwerking van besmette partijen.